Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertsechsundvierzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1924

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis.



Untersuchungen über Autolyse. II.

Von

P. Rona und **E. Mislowitzer.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

Mit 23 Abbildungen im Text.

Im weiteren Verfolg unserer Untersuchungen über die Autolyse[1]) prüften wir die Wirkung der Neutralsalze auf diesen Prozeß, da vor dem Studium der Beeinflussung des autolytischen Abbaues durch irgend eine andere Verbindung zunächst über diesen Punkt Klarheit gewonnen werden mußte. Dabei wurden die Versuche so angeordnet, daß zuerst die Anionen in wechselnder Konzentration bei optimaler Reaktion, dann außerhalb des optimalen Gebietes geprüft wurden, dann die physiologisch wichtigeren Kationen einzeln und in Kombination, ebenfalls bei optimaler und nicht optimaler Reaktion.

Die Autolyse wurde auch in dieser Arbeit an der Meerschweinchenleber studiert. Die Technik blieb unverändert, nur wurde die steril entnommene Leber vor dem Passieren des Latapies nicht mehr zum Gefrieren gebracht, da es sich herausstellte, daß das überflüssig ist.

Der Leberbrei wurde mit der Pufferlösung stets zu einer Suspension verdünnt. Von dieser Suspension wurden je 20 ccm in die einzelnen Kölbchen getan, in denen bereits 20 ccm der jeweiligen Salzlösung bzw. 20 ccm destillierten Wassers waren. Die in den einzelnen Versuchen angegebenen Salzkonzentrationen, ferner die Werte für den Gesamt-N und Rest-N beziehen sich stets auf diese 1 : 1 verdünnte Suspension.

Bezüglich der Methodik sind noch folgende Angaben zu machen.

Bei der Stickstoffbestimmung kam, wie in der vorherigen Arbeit, die von *Bang* angegebene in Anwendung. Normalität der Lösungen n/200; der Titer wurde täglich neu festgestellt.

Was die Fehlermöglichkeiten bzw. -grenzen anlangt, so wären folgende Punkte zu berücksichtigen:

1. *Der „blinde Stickstoff“.* Der N der angewandten Lösungen im „blinden“ Versuche betrug nie mehr als 0,02 mg, in der Mehrzahl aller Untersuchungen 0,015 mg. Die größten überhaupt wahrgenommenen Differenzen zwischen zwei Bestimmungen des blinden N betrugen etwa 30 Proz. Die Größenordnung des zu analysierenden N wählten wir 20- bis 30mal so groß wie die Menge des blinden N, so daß seine größten Schwankungen 1 bis 1,5 Proz. des analysierten N betrugen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 517, 1923.

2. *Pipettierungs- und Titrationsfehler.* Bei Kontrollbestimmungen von N-Mengen aus völlig homogenen Lösungen fanden wir Differenzen der Bestimmungen untereinander um höchstens ein bis zwei Tropfen, das sind 0,003 bis 0,007 mg N. Bei zu analysierenden N-Mengen von 0,4 bis 0,5 mg wäre hierdurch ein maximaler Fehler von 1,5 Proz. anzunehmen.

3. *Fehler aus der Ungleichmäßigkeit der zu pipettierenden Lebersuspension, aus der Enteiweißung usw.* Im einzelnen lassen sich diese Fehlerquellen nicht genau feststellen; durch Doppelanalysen, die stets durchgeführt wurden, läßt sich jedoch die Gesamtfehlerbreite wohl angeben. Zur Feststellung des Rest-N in 5 ccm der Suspension pipettierten wir zweimal je 5 ccm in je ein Becherglas, enteiweißten jede Portion für sich durch Hitzekoagulation im isoelektrischen Punkt und nachträgliche Behandlung mit Ferrum oxyd. dialysat., füllten die Gesamtmenge je in einen hohen Meßzylinder bis zu einer bestimmten Marke auf, filtrierten jede Probe in ein Becherglas und pipettierten einen aliquoten Teil aus jedem Becherglas in je einen Mikrokjeldahlkolben zur N-Bestimmung. Die bei der Titration aus der völlig getrennten Behandlung der zwei Portionen erhaltenen Werte unterschieden sich zumeist nur um 0,1 bis 0,2 ccm n/200 Lösung, manchmal noch weniger. Unterschiede von 0,3 ccm (0,021 mg N) kamen nur sehr selten vor; darüber hinaus wurden keine Zahlenpaare verwertet. Der Mittelwert aus den beiden Analysenzahlen wurde der Umrechnung zugrunde gelegt.

Der Analysengang eines beliebig herausgegriffenen Falles sei ausführlich mitgeteilt.

Versuch vom 25. Mai 1923. Abnahme nach 4 Stunden. Zweimal je 5 ccm entnommen, enteiweißt, auf 50 ccm aufgefüllt (17, 18, 19, 20 auf 60 ccm aufgefüllt), je 25 ccm vom Filtrat verascht. Vorgelegt für 1 und 2 je 10 ccm n/200 H_2SO_4, für 3 bis 20 je 20 ccm.

Nr.	Thiosulfat n/200 zurücktitriert ccm		H_2SO_4 n/200 gebunden ccm	mg N	mg N in 5 ccm der Suspension	mg N in Proz. des Gesamt-N
1	0,55	0,50	9,50	$0{,}665_0$	1,330	31,2
2	0,45					
3	8,92	9,00	11,00	$0{,}770_0$	1,540	36,2
4	9,07					
5	7,02	7,13	12,87	$0{,}900_9$	$1{,}801_8$	42,3
6	7,23					
7	8,93	8,84	11,16	$0{,}781_2$	$1{,}562_4$	36,6
8	8,75					
9	7,97	7,87	12,13	$0{,}849_1$	$1{,}698_2$	39,9
10	7,77					
11	7,10	7,03	12,97	$0{,}907_9$	$1{,}815_8$	42,6
12	6,97					
13	10,77	10,69	9,31	$0{,}651_7$	$1{,}303_4$	30,6
14	10,62					
15	8,66	8,73	11,27	$0{,}788_9$	$1{,}577_8$	37,2
16	8,80					
17	9,60	9,70	10,30	$0{,}721_0$	$1{,}730_4$	40,6
18	9,80					
19	9,55	9,64	10,24	$0{,}716_8$	$1{,}720_6$	40,4
20	9,72					

Die maximale Differenz zweier Titrationswerte betrug hier 0,3 ccm n/200 = 0,021 mg N. Nehmen wir in einem konkreten Beispiel die Titrationswerte 13,42 und 13,72 ccm n/200 Thiosulfat, so sind bei vorgelegten 20 ccm n/200 H_2SO_4 die N-Werte $0{,}460_6$ bzw. $0{,}439_6$ mg. Der Mittelwert $0{,}450_1$ mg N unterscheidet sich um 2,25 bzw. 2,40 Proz. von den gefundenen Werten. Ausschläge über 3 Proz. wurden als unabhängig von der Methode verwertet. Auf Prozentzahlen des Gesamt-N berechnet waren bei den beobachteten Spaltungswerten von 25 bis 50 Proz. 0,75 bis 1,5 Proz. Fehler zu verzeichnen. Geringe Differenzen in den Prozentzahlen der Spaltung gestatten demnach schon einen Einblick in den Spaltungsverlauf unter verschiedenen Bedingungen.

Die angewandten Salze waren reinste Salze von *Kahlbaum*. Die alkalisch reagierenden Salze (Acetat, Tartrat usw.) wurden mit Hilfe der ihnen entsprechenden Säuren auf den gewünschten p_H gebracht, wobei stets Gemische von gleicher Molarität angewendet wurden. Als Maß der Autolyse diente wieder der Reststickstoff, dessen Größe das beste Bild von dem Umfang des autolytischen Prozesses liefert, sicherlich ein genaueres als das, das aus der Bestimmung der Aminogruppen zu gewinnen ist. Auf die Sterilität wurde ganz besonders geachtet; zur Sicherheit wurden außerdem jedem Kölbchen einige Tropfen Toluol zugefügt. Bakterien konnten nie nachgewiesen werden.

I. Anionenversuche.

Zuerst wurden NaCl, Na_2SO_4 und Natriumcitrat in m/2 Konzentration bei einem p_H von etwa 3,6 untersucht.

Versuch 1 (Abb. 1). 13,4 g Leberbrei + 50 ccm Milchsäurepuffer (zwe Teile Milchsäure, ein Teil Natriumlactat; Pufferkonzentration in den autolysierenden Kolben n/12). Zugesetztes Salz im Kölbchen 1: Na_2SO_4; 2: NaCl; 3: Na-Citrat; 4: destilliertes Wasser.

In 5 ccm der Suspension 7,14 mg Gesamt-N und 0,55 mg Rest-N. Nach 18 Stunden wurden aus jedem Kölbchen zweimal je 5 ccm entnommen, enteiweißt, der Rest-N bestimmt (Milligramm).

Kolben 1: 2,20; 2: 2,49; 3: 2,34; 4: 4,39.

In Prozenten des Gesamt-N, 1: 30,8; 2: 35,0; 3: 33,0; 4: 61,5.

Die elektrolytischen p_H-Messungen ergaben, 1: 3,45; 2: 3,48; 3: 3,58; 4: 3,50.

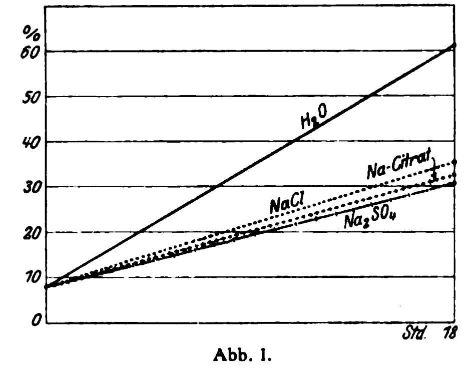


Abb. 1.

Die Spaltung ging in der Probe ohne Salz (nur mit dem Puffergemisch) bis zu 61 Proz., die Autolyse betrug demnach etwa 50 Proz.; in den drei m/2 Sulfat-, Chlorid- und Citratportionen betrug sie nur etwa 20 Proz.

Der nächste Versuch wurde außer mit den obigen Salzen noch mit Acetat und Tartrat durchgeführt. Zusammensetzung wie in 1. Abnahme nach 4, 24 und 48 Stunden.

Versuch 2 (Abb. 2). 14,3 g Leberbrei mit 60 ccm Milchsäurepuffer (Konzentration n/12). Im Kölbchen 1: Na-Sulfat; 2: Na-Chlorid;

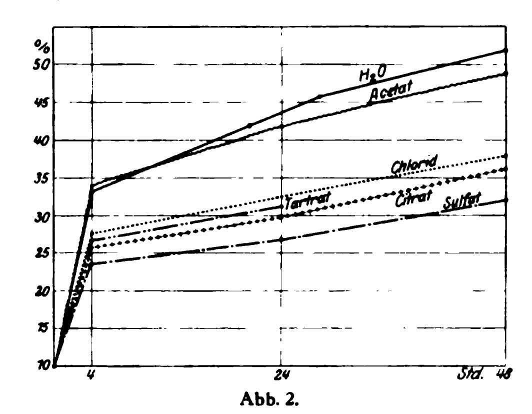


Abb. 2.

3: Na-Citrat; 4: Na-Acetat; 5: Na-Tartrat; 6: statt Salzlösung entsprechende Menge destilliertes Wasser (in der Abb. mit „H_2O“ bezeichnet). In 5 ccm der Suspension 7,28 mg Gesamt-N und 0,77 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std. . . .	1,69	2,02	1,87	2,46	1,94	2,42
„ „ „ 24 „ . . .	1,99	2,36	2,08	3,04	2,30	3,31
„ „ „ 48 „ . . .	2,38	2,75	2,44	3,56	—	3,78
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 4 Std.	23,6	27,5	25,7	33,9	26,7	33,2
„ „ „ „ „ „ 24 „	26,8	32,5	28,6	41,8	31,6	45,6
„ „ „ „ „ „ 48 „	32,8	37,7	33,5	48,9	—	52,0
p_H (elektr.)	3,60	3,60	3,58	3,67	3,80	3,68

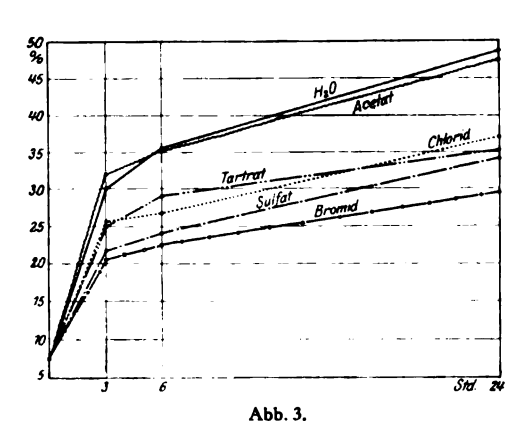


Abb. 3.

Im Kolben 1: NaCl; 2: Na_2SO_4; 3: NaBr; 4: Na-Tartrat + Weinsäure; 5: Na-Acetat + Essigsäure; 6: statt der Salzlösung destilliertes Wasser (in der Abbildung „H_2O“).

Eine gleich starke Hemmung ist auch in diesem Versuche für Sulfat, Chlorid und Citrat und nun auch für Tartrat zu beobachten, während der Einfluß des Acetats unerheblich ist.

Versuch 2a (Abb. 3). m/2 Anionenreihe im Optimum (p_H 3,7). In 5 ccm der Suspension 6,018 mg Gesamt-N und 0,479 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std. . . .	1,53	1,29	1,23	1,52	1,93	1,80
,, ,, ,, 6 ,, . . .	1,59	1,41	1,36	1,76	2,12	2,14
,, ,, ,, 24 ,, . . .	2,19	2,02	1,78	2,11	2,85	2,93
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 3 Std.	25,4	21,5	20,5	25,2	32,0	30,0
,, ,, ,, ,, ,, ,, 6 ,,	26,4	23,4	22,6	29,3	35,2	35,6
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	36,4	33,6	29,6	35,1	47,5	48,7

Dieser Versuch bestätigt die starke Hemmung des Prozesses für Sulfat, Chlorid und Tartrat, ebenso wie die Unschädlichkeit des Acetats. Er läßt ferner die stark hemmende Wirkung des Bromids erkennen.

In guter Übereinstimmung zeigen diese drei Versuche, daß die bisher untersuchten Salze bzw. Anionen in der angewandten Konzentration mit Ausnahme vom Acetat im Optimum der Autolyse auf die Geschwindigkeit und auf den Umfang des Prozesses stark hemmend wirken.

Die folgenden Versuche zeigen, wie sich dieselben Salze abseits vom Optimum verhalten.

Versuch 3 (Abb. 4). 10,2 g Leberbrei mit 60 ccm Milchsäurepuffer 1 : 8. Endgültige Pufferkonzentration n/12. Gesamt-N in 5 ccm Suspension 5,54 mg, Rest-N 0,42 mg.

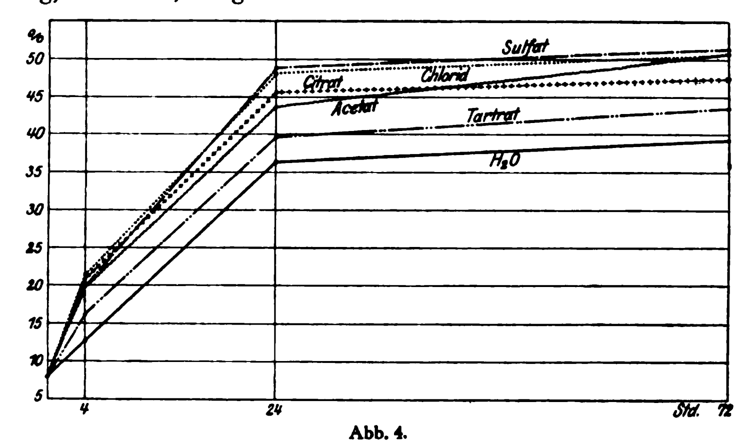


Abb. 4.

Im Kölbchen 1: Na_2SO_4; 2: NaCl; 3: Natriumcitrat; 4: Natriumacetat; 5: Natriumtartrat; 6: destilliertes Wasser. Salzkonzentration m/2.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std. . . .	1,10	1,19	1,18	1,10	0,89	0,71
,, ,, ,, 24 ,, . . .	2,71	2,67	2,54	2,43	2,19	2,01
,, ,, ,, 72 ,, . . .	2,85	2,79	2,62	2,79	2,42	2,17
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 4 Std.	19,9	21,5	21,2	19,9	16,3	12,9
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	48,8	48,3	45,8	43,9	39,5	36,4
,, ,, ,, ,, ,, ,, 72 ,,	51,4	50,4	47,2	50,1	43,7	39,2
p_H (elektr.)	4,86	4,76	4,83	4,78	4,98	4,76

Dieser Versuch zeigt eine völlige Umkehr der Salzwirkung, Förderung statt Hemmung durch Änderung der Acidität. Besonders deutlich gilt diese Umkehr für das Natriumsulfat, das im Optimum am stärksten hemmt, hier am stärksten fördert.

Abb. 5.

Versuch 3a (Abb. 5). 9,5 g Leberbrei mit Milchsäurepuffer (wie im Versuche 3). Gesamt-N (in 5 ccm) 5,14 mg, Rest-N 0,36 mg.

Im Kölbchen 1: NaCl; 2: Na_2SO_4; 3: NaBr; 4: Na-Tartrat + Weinsäure; 5: Na-Acetat + Essigsäure; 6: destilliertes Wasser. Salzkonzentration m/2, p_H 5,0.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std. . . .	1,21	0,97	0,92	1,16	0,97	0,90
,, ,, ,, 8 ,, . . .	1,66	1,44	1,21	1,68	1,36	1,26
,, ,, ,, 24 ,, . . .	2,22	1,92	1,68	2,20	1,70	1,48
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 4 Std.	23,5	18,9	17,9	22,6	18,8	17,5
,, ,, ,, ,, ,, ,, 8 ,,	32,3	28,1	23,5	32,6	26,5	24,5
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	43,2	37,4	32,7	42,8	33,3	28,8

Dieser Versuch bestätigt den vorhergehenden und läßt wieder eine erhebliche Vermehrung der Spaltung in einigen mit Salz versetzten Suspensionen erkennen.

Für den nächsten Versuch wählten wir ein p_H von 6,0.

Versuch 4 (Abb. 6). 15,3 g Leberbrei mit 60 ccm Phosphatpuffer. Endgültige Pufferkonzentration n/12. Gesamt-N (in 5 ccm) 7,52 mg Rest-N 0,64 mg. Salzverteilung wie im Versuche 3.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std. . . .	0,90	0,91	1,81	0,98	0,94	0,86
,, ,, ,, 24 ,, . . .	1,93	1,64	1,94	1,75	1,68	1,60
,, ,, ,, 48 ,, . . .	2,27	2,08	2,19	2,05	2,23	1,93
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 4 Std.	12,0	12,1	14,7	13,0	12,5	11,5
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	25,6	21,8	25,7	23,2	22,3	21,3
,, ,, ,, ,, ,, ,, 48 ,,	30,3	27,6	27,2	27,3	29,6	25,6
p_H (elektr.)	5,97	5,98	5,85	5,88	5,97	6,10

Die Differenzen zwischen dem „Wasserwerte" und den „Salzwerten" sind in diesem Versuche zwar geringer als in den vorhergehenden. Dies läßt sich unschwer aus der bei einem p_H von 6,0 an und für sich

schwächer als bei einem p_H von 5,0 verlaufenden Autolyse erklären. Trotzdem ist die Förderung deutlich nachweisbar und die Richtung der Werte durchaus die gleiche. Eine „Salzwirkung“ ist in allen sechs

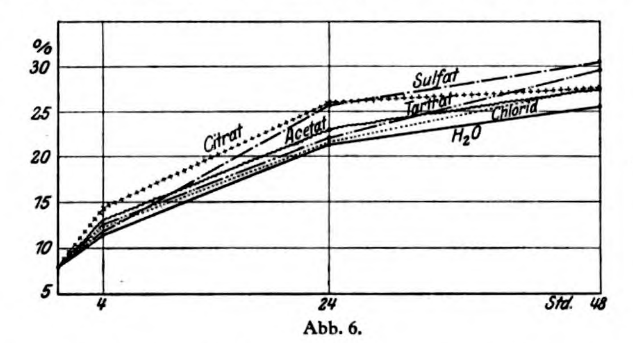


Abb. 6.

Versuchen festgestellt, und die große Bedeutung der Art der Anionen (oder der Säuremoleküle) zur Erzielung dieser Wirkung ist aus den Kurvenbildern ersichtlich.

II. Kationenversuche.

1. Untersucht wurde zunächst die Wirkung von Na, K, Ca in verschiedenen Konzentrationen im optimalen Reaktionsgebiete auf den Ablauf der Autolyse.

Versuch 5 (Abb. 7). Die ausgezogene Linie in der Abbildung gibt den Versuch mit destilliertem Wasser wieder. 15,9 g Leberbrei + 100 ccm Milchsäurepuffer (1,5 : 1,0). Gesamt-N in 5 ccm der Suspension 4,26 mg, Rest-N 0,94 mg.

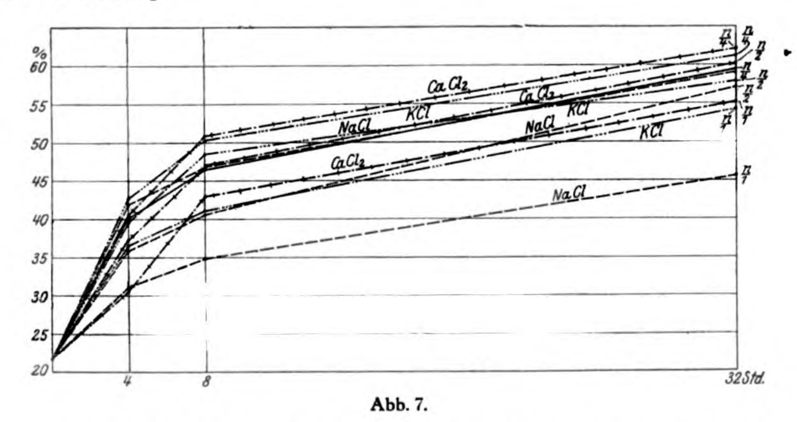


Abb. 7.

Kolben 1: 1 n NaCl; 2: n/2 NaCl; 3: n/4 NaCl; 4: 1 n KCl; 5: n/2 KCl; 6: n/4 KCl; 7: 1 n $CaCl_2$; 8: n/2 $CaCl_2$; 9: n/4 $CaCl_2$; 10: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rest-N, mg nach 4 Std. . .	1,33	1,54	1,80	1,56	1,69	1,81	1,30	1,58	1,73	1,72
„ 8 „ . .	1,49	1,74	2,02	1,75	2,08	2,14	1,86	2,01	2,17	1,99
„ 72 „ .	1,95	2,43	2,52	2,31	2,49	2,62	2,34	2,56	2,66	2,55
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N nach 4 Std. . .	31,2	36,1	42,3	36,6	39,9	42,6	30,0	37,2	40,6	40,4
„ 8 „ . .	34,9	40,9	47,0	41,1	48,7	50,3	43,6	47,1	50,8	46,9
„ 72 „ . .	45,7	57,1	59,1	54,3	58,0	61,6	55,0	60,0	62,4	59,8
p_H (elektr.)	3,78	—	—	3,78	—	—	3,83	3,79	3,79	3,78

Versuch 6 (Abb. 7a). 15 g Leberbrei + 100 ccm Pufferlösung, wie vorher. In 5 ccm der Suspension 3,69 mg Gesamt-N und 0,45 mg Rest-N. p_H wie im Versuche 5.

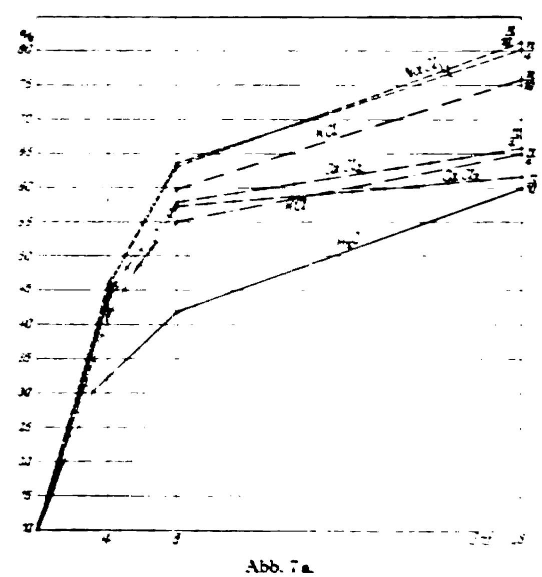


Abb. 7a.

Kolben 1: n/4 NaCl; 2: n/7 NaCl; 3: n/10 NaCl; 4: n/4 KCl; 5: n/7 KCl; 6: n/10 KCl; 7: n/4 $CaCl_2$; 8: n/7 $CaCl_2$; 9: n/10 $CaCl_2$; 10: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rest-N mg nach 4 Std. . .	1,69	1,66	1,67	1,65	1,55	1,67	1,67	1,55	1,52	1,12
„ 8 „ . .	2,35	2,25	2,34	2,03	2,04	2,20	2,14	2,07	2,11	1,56
„ 72 „ . .	2,96	2,72	2,99	2,42	2,41	2,79	2,43	2,47	2,28	2,22
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N nach 4 Std. . .	45,8	45,1	45,1	44,8	41,9	45,2	45,3	42,0	41,2	30,0
„ 8 „ . .	63,6	60,8	63,4	55,0	55,2	59,5	57,9	55,9	57,2	42,1
„ 72 „ . .	80,1	73,7	81,1	65,5	65,2	75,7	65,8	66,9	61,8	60,0

Aus diesen zwei Versuchen geht hervor, daß bei der optimalen Reaktion der autolytischen Spaltung NaCl, KCl und $CaCl_2$ in stärkeren

Konzentrationen hemmen, in mittleren unwirksam sind und in schwächeren den Fermentprozeß fördern. Im Versuche 5 hemmt NaCl stärker als KCl, während das $CaCl_2$ sich nur unwesentlich vom KCl unterscheidet, und im Versuche 6 fördert das NaCl stärker als KCl und $CaCl_2$, deren Werte im wesentlichen miteinander übereinstimmen.

Die nächsten Versuche sollten noch genauer über die Wirkungsverschiedenheiten des Na und K bei optimaler Reaktion und gleichzeitig über die kombinierte Wirkung dieser Ionen unterrichten.

Versuch 7. NaCl und KCl in 1 n (End)konzentration. 11 g Leberbrei + 70 ccm Milchsäurepuffer (1,5 : 1,0). Endgültige Pufferkonzentration n/12. Gesamt-N in 5 ccm der Suspension 5,04 mg, Rest-N 0,32 mg.

Kolben 1: NaCl; 2: KCl; 3: NaCl (90 Proz.) + KCl (10 Proz.); 4: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,42	1,58	1,31	1,70
„ „ „ 24 „	2,68	2,82	2,65	2,93
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	25,2	29,0	23,2	30,0
„ „ „ „ „ „ 24 „	47,2	50,5	47,0	53,3
p_H (elektr.)	3,51	3,64	3,48	3,64

Versuch 8 (Abb. 8). NaCl und KCl in 1 n (End)konzentration. 17 g Leberbrei + 70 ccm Milchsäurepuffer (1,5 : 1,0). Endgültige Pufferkonzentration n/12. Gesamt-N in 5 ccm der Lebersuspension 6,73 mg, Rest-N 0,50 mg.

Kölbchen 1: NaCl; 2: KCl; 3: NaCl (98 Proz.), KCl (2 Proz.); 4: destilliertes Wasser.

Abb. 8.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,71	1,92	1,68	2,05
„ „ „ 24 „	3,18	3,40	3,10	3,59
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	25,5	28,5	24,8	30,5
„ „ „ „ „ „ 24 „	47,3	50,0	46,1	53,4
p_H (elektr.)	3,72	3,68	3,70	3,76

Versuch 9. (Abb. 9). NaCl und KCl 1 n (End)konzentration. 18 g Leberbrei und 60 ccm Milchsäurepuffer (1,5 : 1,0). Endgültige Puffer-

konzentration n/12. Gesamt-N in 5 ccm Suspension 8,34 mg, Rest-N 0,68 mg.

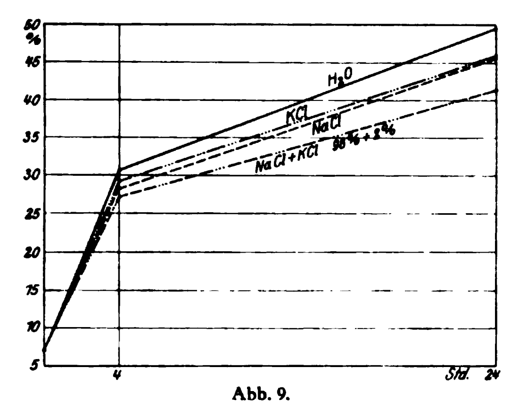


Abb. 9.

Kolben 1: NaCl; 2: KCl; 3: NaCl (98 Proz.) + KCl (2 Proz.); 4: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	2,34	2,42	2,27	2,55
„ „ „ 24 „	3,79	3,82	3,44	4,13
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	28,1	29,0	27,2	30,6
„ „ „ „ „ „ 24 „	45,4	45,8	41,2	49,5
p_H (elektr.)	3,66	3,62	3,64	37,0

Übereinstimmend zeigen die Versuche 7, 8 und 9 eine stärkere Hemmung der Proteolyse durch das NaCl als durch das KCl, und merkwürdigerweise hemmte viel NaCl neben wenig KCl noch stärker als eins dieser Salze allein. Diese Beobachtung veranlaßte uns, die Wirkung dieser Ionenkombinationen näher zu untersuchen.

Der nächste Versuch 10 mit n/10 Salzkonzentration bestätigte die bisherigen Ergebnisse: K ist dem Na weit voraus, die Werte aus den Gemischen liegen entsprechend ihrer Zusammensetzung zwischen den Na- und K-Werten, hingegen hemmt viel Na mit wenig K wieder, wenn auch wenig, doch deutlich.

Versuch 10. n/10 NaCl und KCl (NaCl mit abgestuften Mengen KCl) im Optimum (p_H 3,70). 30 g Leberbrei und 100 ccm Milchsäurepuffer (n/12). In 5 ccm der Suspension Gesamt-N 5,60 mg, Rest-N 0,47 mg.

Kolben 1: n/10 Na; 2: n/10 KCl; 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.); 4: NaCl (66,6 Proz.) + KCl (33,3 Proz.); 5: NaCl (75 Proz.) + KCl (25 Proz.); 6: NaCl (87,5 Proz.) + 12,5 Proz.; 7: NaCl (95 Proz.) + KCl (5 Proz.); 8: NaCl (98 Proz.) + KCl (2 Proz.); 9: NaCl (99 Proz.) + KCl (1 Proz.); 10: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rest-N, mg nach 4 Std. . .	1,55	1,72	1,67	1,55	1,58	1,64	1,61	1,51	1,47	1,55
„ 8 „ . .	1,84	1,99	1,88	1,58	1,76	—	1,84	1,72	—	1,77
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N nach 4 Std. . .	27,7	30,7	29,8	27,7	28,3	29,2	28,6	26,9	26,3	27,7
„ 8 „ . .	32,9	35,4	33,4	28,2	31,3	32,9	33,4	30,7	—	31,6

Das gleiche Bild ergibt der nächste Versuch 11, der mit n/4 Salzkonzentration angestellt wurde. Er zeigt wieder die großen Unterschiede zwischen Na und K und ferner die Wirkung des Gemisches von viel NaCl mit wenig KCl.

Versuch 11 (Abb. 10). n/4 NaCl und KCl im Optimum (p_H 3,84). (NaCl mit abgestuften Mengen KCl). 16,2 g Leberbrei und 100 ccm Milchsäurepuffer. In 5 ccm der Suspension 3,41 mg Gesamt-N und $0,31_6$ mg Rest-N.

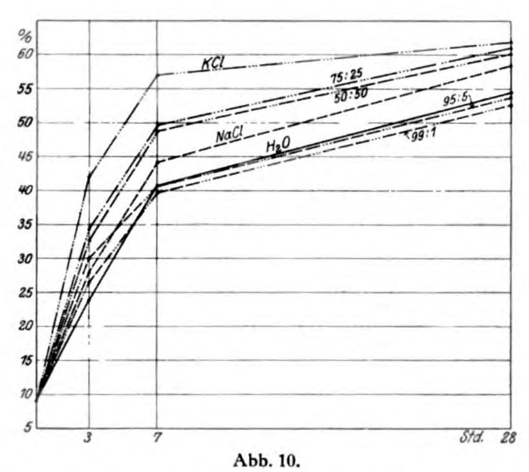


Abb. 10.

Kolben 1: NaCl; 2: KCl; 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.); 4: NaCl (66,6 Proz.) + KCl (33,3 Proz.); 5: NaCl (75 Proz.) + KCl (25 Proz.); 6: NaCl (87,5 Proz.) + KCl (12,5 Proz.); 7: NaCl (95 Proz.) + KCl (5 Proz.); 8: NaCl (99 Proz.) + KCl (1 Proz.); 9: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,18	1,43	1,11	1,06	1,15	1,09	1,03	0,92	0,85
„ 7 „	1,51	1,96	1,66	1,67	1,67	1,53	1,38	1,35	1,39
„ 28 „	1,98	2,11	2,01	2,09	2,07	1,86	1,83	1,81	1,85
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 3 Std.	27,6	42,0	32,6	31,3	33,6	32,0	30,2	26,9	24,9
„ 7 „	44,2	57,5	48,8	48,9	48,9	44,9	40,6	39,7	40,6
„ 28 „	58,0	61,8	58,9	61,4	60,6	54,5	53,7	53,0	54,0

Auch der folgende Versuch zeigt dieselben Verhältnisse.

Versuch 12. (Abb. 11). n/4 KCl und NaCl (KCl mit abgestuften Mengen NaCl) bei p_H 3,80. 26,8 g Leberbrei mit 100 ccm Milchsäurepuffergemisch (n/12). In 5 ccm der Suspension 5,38 mg Gesamt-N und 0,36 mg Rest-N.

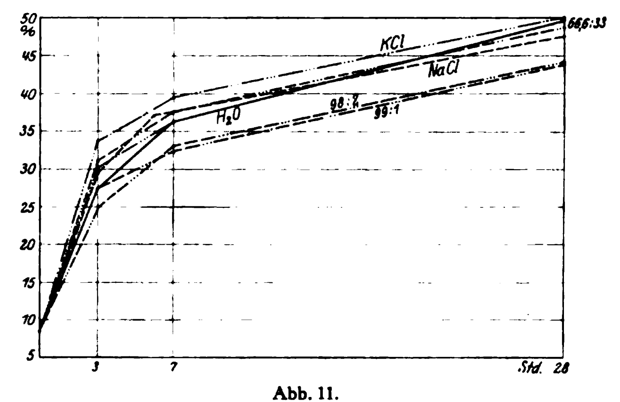


Abb. 11.

Kölbchen 1: KCl; 2: NaCl; 3: KCl (66,6 Proz.) + NaCl (33,3 Proz.); 4: KCl (75 Proz.) + NaCl (25 Proz.); 5: KCl (87,5 Proz.) + NaCl (12,5 Proz.); 6: KCl (95 Proz.) + NaCl (5 Proz.); 7: KCl (98 Proz.) + NaCl (2 Proz.); 8: KCl (99 Proz.) + NaCl (1 Proz.); 9: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,81	1,66	1,67	1,62	1,62	1,59	1,34	1,50	1,49
„ 7 „	2,13	1,99$_9$	2,03	1,97	1,98	1,99	1,79	1,79	1,94
„ 28 „	2,71	2,57	2,59	2,66	—	2,68	2,37	2,37	2,67
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 3 Std.	33,7	29,9	31,1	30,2	30,1	29,7	25,1	27,9	27,7
„ 7 „	39,7	37,2	37,8	36,7	36,8	37,1	33,4	33,3	36,2
„ 28 „	50,2	47,9	48,3	49,4	—	49,9	44,2	44,1	49,6

In weiteren Versuchen prüften wir die Einwirkung des Na und K auf den proteolytischen Prozeß unter Variierung des gegenseitigen Verhältnisses der beiden Ionenarten. Diese seien in Auszügen wiedergegeben.

Versuch 13. n/4 NaCl und KCl im Optimum (p_H 3,70). 18,6 g Leberbrei mit 120 ccm Milchsäurepufferlösung. In 5 ccm Suspension 4,27 mg Gesamt-N und 0,34 mg Rest-N.

Kolben 1: NaCl; 2: KCl; 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.); 4: NaCl (75 Proz.) + KCl (25 Proz.); 5: NaCl (99 Proz.) + KCl (1 Proz.); 6: NaCl (25 Proz.) + KCl (75 Proz.); 7: NaCl (12 Proz.) + KCl (88 Proz.); 8: NaCl (1 Proz.) + KCl (99 Proz.); 9: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,43	1,53	1,46	1,48	1,25	1,33	1,34	1,33	1,34
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	33,6	35,8	34,1	34,8	29,3	31,1	31,2	31,1	31,4

Versuch 14. n/10 NaCl und KCl im Optimum (p_H 3,80). Milchsäurepufferung einmal mit Natriumlactat, einmal mit Kaliumlactat. In 5 ccm Suspension 4,69 mg Gesamt-N und 0,33 mg Rest-N.

Kölbchen 1: NaCl (im Puffer Natriumlactat); 2: KCl (im Puffer Kaliumlactat); 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.) (im Puffer Na- und K-Lactat); 4: NaCl (99 Proz.) + KCl (1 Proz.) (im Puffer Natriumlactat); 5: NaCl (12 Proz.) + KCl (88 Proz.) (im Puffer Kaliumlactat); 6: NaCl (1 Proz.) + KCl (99 Proz.) (im Puffer Kaliumlactat); 7: destilliertes Wasser (im Puffer Natriumlactat); 8: destilliertes Wasser (im Puffer Kaliumlactat).

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,21	1,29	1,11	1,17	1,08	1,30	1,21	1,10
„ „ „ 6 „	$1,49_9$	1,67	1,42	1,56	1,36	1,56	1,51	1,40
„ „ „ 24 „	1,97	2,14	1,70	1,86	1,72	1,99	2,01	1,93
Rest-N in Proz. des Gesamt-N n. 3 Std.	26,0	27,7	23,6	25,0	23,0	27,8	25,9	23,6
„ „ „ „ „ „ 6 „	32,0	35,6	30,4	31,7	29,1	33,2	32,3	29,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	42,1	45,7	36,3	39,7	36,8	42,5	43,0	41,2

Dieser Versuch gestattet, den Einfluß sehr geringer Na- und Ka-Konzentrationen zu verfolgen. In den nur mit Pufferlösung versetzten Suspensionen ist die Na- bzw. K-Konzentration etwa n/25. — In diesen Konzentrationen ist der Einfluß des Na etwas günstiger als der des K: die Natriumkurve liegt ein wenig über der Kaliumkurve. Bei höheren Konzentrationen (n/4 und n/10) tritt die hemmende Wirkung des Na gegenüber dem K zutage.

Versuch 15. Salze und Puffer wie im Versuche 14. In 5 ccm der Suspension 4,33 mg Gesamt-N und 0,45 mg Rest-N. $p_H = 3,65$.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,11	1,36	1,22	1,08	1,24	1,26	1,26	1,22
„ „ „ 6 „	1,42	1,73	1,47	1,36	1,67	1,70	1,67	1,64
„ „ „ 24 „	1,75	1,93	1,80	1,84	1,79	1,86	1,84	1,93
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 3 Std.	25,7	31,6	28,2	24,9	28,6	29,1	29,1	28,2
„ „ „ „ „ „ 6 „	32,8	40,0	34,1	31,5	38,6	39,5	38,6	37,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	40,6	44,8	41,6	42,6	41,4	43,6	42,6	44,6

Alles in allem ist die Wirkung der betreffenden Salze in den angewandten Konzentrationen nur gering. Zusammenfassend läßt sich auf Grund der gleichartig verlaufenden Versuche doch sagen, daß bei der optimalen Reaktion der Autolyse das Natrium stärker hemmt (Konzentration 1 n und n/2) und weniger fördert (Konzentration n/4, n/7 und n/10) als das Kalium. Natrium- und Kaliumgemische verhalten sich, wie es sich nach der Zusammensetzung der Gemische erwarten läßt; nur die Wirkung des Gemisches von viel Na mit sehr wenig K ist abweichend, indem eine stärkere Hemmung gegenüber der Natrium- und Kaliumwirkung allein zu beobachten war.

Um den Einfluß des Calciums und des Calciums + Natriums kennenzulernen, stellten wir die drei weiteren Versuche an.

Der folgende Versuch zeigt, daß die Calciumkurve in unmittelbarer Nähe der Kaliumkurve verläuft; die Natriumkurve liegt tiefer.

Versuch 16 (Abb. 12). n/7 NaCl, KCl und $CaCl_2$ im Optimum (p_H der Suspensionen bzw. 3,46, 3,55, 3,57). 26,8 g Leberbrei mit 180 ccm Milchsäurepuffer. In 5 ccm der Suspension 5,38 mg Gesamt-N, 0,36 mg Rest-N.

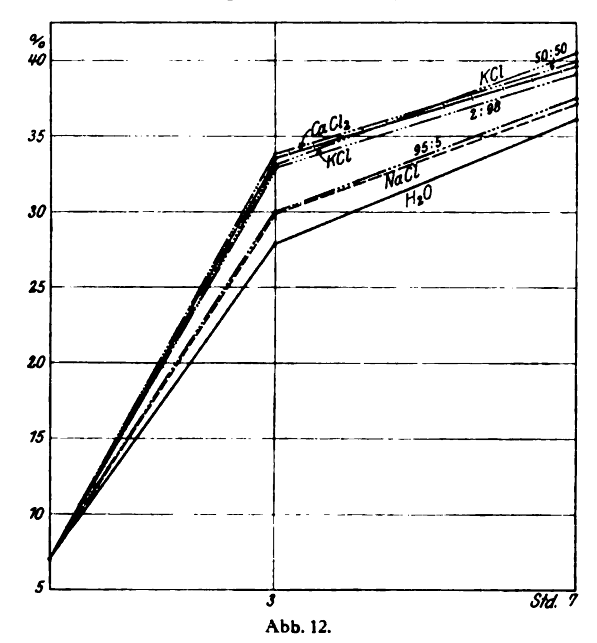


Abb. 12.

Kolben 1: NaCl; 2: $CaCl_2$; 3: KCl; 4: NaCl (50 Proz.) + $CaCl_2$ (50 Proz.); 5: NaCl (95 Proz.) + $CaCl_2$ (5 Proz.); 6: NaCl (2 Proz.) + $CaCl_2$ (98 Proz.); 7: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,66	1,79	1,81	1,81	1,61	1,61	1,49
„ „ „ 7 „	1,99	2,10	2,13	2,16	2,01	2,12	1,94
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N n. 3 Std.	29,9	33,3	33,7	33,7	29,9	33,1	27,7
„ „ „ „ „ „ 7 „	37,2	40,7	39,7	40,0	37,5	39,4	36,2

Ein ganz ähnliches Bild ergibt der nächste Versuch.

Versuch 17. n/7 NaCl und $CaCl_2$ im Optimum (p_H 3,60) 14,5 g Leberbrei mit 120 ccm Milchsäurepufferlösung. In 5 ccm der Suspension 4,86 mg Gesamt-N und 0,35 mg Rest-N.

Kolben 1: NaCl; 2: $CaCl_2$; 3: NaCl (50 Proz.) + $CaCl_2$ (50 Proz.); 4: NaCl (99 Proz.) + $CaCl_2$ (1 Proz.); 5: NaCl (1 Proz.) + $CaCl_2$ (99 Proz.); 6: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std. . . .	1,45	1,69	1,64	1,64	1,65	1,40
„ „ „ 7 „ . . .	1,81	1,96	1,90	1,85	1,86	1,77
„ „ „ 40 „ . . .	1,97	2,10	1,99	1,98	2,11	1,91
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 3 Std.	29,8	34,8	33,7	33,8	34,0	29,7
„ „ „ „ „ „ 7 „	37,3	40,4	39,2	38,2	38,3	36,6
„ „ „ „ „ „ 40 „	40,6	43,2	41,1	40,8	43,4	39,5

Ähnlich liegen die Verhältnisse auch im folgenden Versuche.

Versuch 18 (Abb. 13). n/10 NaCl und $CaCl_2$. Milchsäurepufferung mit Natriumlactat bzw. Calciumlactat. 20 g Leberbrei mit 100 ccm Pufferlösung. In 5 ccm Suspension 4,97 mg Gesamt-N und 0,46 mg Rest-N.

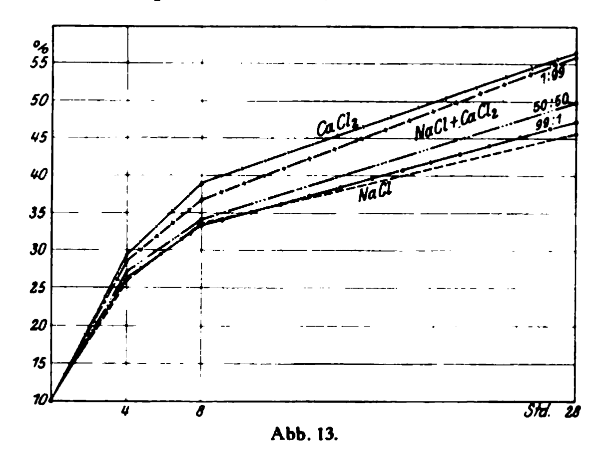


Abb. 13.

Kolben 1: NaCl (im Puffer Na); 2: $CaCl_2$ (im Puffer Ca); 3: NaCl (50 Proz.) + $CaCl_2$ (50 Proz.) (im Puffer Na und Ca); 4: NaCl (99 Proz.) + $CaCl_2$ (1 Proz.) (im Puffer Na); 5: NaCl (1 Proz.) + $CaCl_2$ (99 Proz.) (im Puffer Ca). p_H der Suspensionen 3,90.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,27	1,46	1,36	1,33	1,39
„ „ „ 8 „	1,66	1,94	1,70	1,67	1,81
„ „ „ 28 „	2,26	2,82	2,49	2,34	2,78
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	25,5	29,4	27,3	26,8	28,1
„ „ „ „ „ „ 8 „	33,5	39,1	34,3	33,5	36,6
„ „ „ „ „ „ 28 „	45,5	56,8	50,0	47,2	55,9

Bei den Gemischen aus Ca- und Na-Salzen findet sich demnach kein Verhältnis, das besonders fördernd oder hemmend wirkt. Die Kurven der Gemische liegen sämtlich zwischen der Ca- und Na-Kurve. Die Versuche sprechen für eine etwas stärker beschleunigende Wirkung der Ca-Ionen auf die Proteolyse im Verhältnis zu den Natriumionen.

Als drittes Kombinationspaar wurde Kaliumchlorid mit Calciumchlorid genommen. Auch hier läßt sich andeutungsweise eine stärker fördernde Wirkung des Ca gegen das K beobachten.

Versuch 19 (Abb. 14). n/7 KCl und $CaCl_2$ im Optimum (p_H 3,70). 13,6 g Leberbrei mit Milchsäurepufferlösung. In 5 ccm Suspension 3,43 mg Gesamt-N und 0,26 mg Rest-N.

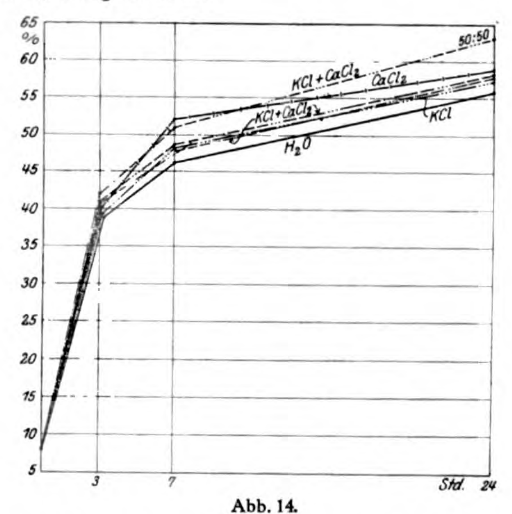


Abb. 14.

Kolben 1: KCl; 2: $CaCl_2$; 3: KCl (50 Proz.) + $CaCl_2$ (50 Proz.); 4: KCl (98 Proz.) + $CaCl_2$ (2 Proz.); 5: KCl (2 Proz.) + $CaCl_2$ (98 Proz.); 6: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std. . . .	1,34	1,36	1,42	1,40	1,39	1,33
,, ,, ,, 7 ,, . . .	1,65	1,80	1,72	1,65	1,65	1,58
,, ,, ,, 24 ,, . . .	1,97	2,02	2,15	2,01	1,98	1,93
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 3 Std.	39,1	39,8	41,8	40,9	40,5	38,8
,, ,, ,, ,, ,, ,, 7 ,,	48,1	52,6	51,0	48,3	48,0	46,0
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	57,4	58,9	62,6	58,6	57,7	56,3

Versuch 20. n/10 KCl und $CaCl_2$ im Optimum (p_H 3,9). 10,9 g Leberbrei mit 100 ccm Milchsäurepufferlösung. In 5 ccm der Suspension 3,54 mg Gesamt-N und 0,26 mg Rest-N.

Anordnung der Kölbchen wie im vorigen Versuche.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std. . . .	1,12	1,13	1,23	1,20	1,17	0,95
,, ,, ,, 7 ,, . . .	1,44	1,45	—	—	—	1,21
,, ,, ,, 28 ,, . . .	1,54	1,64	1,67	1,67	1,65	1,42
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 8 Std.	31,7	31,9	34,7	33,9	32,8	26,9
,, ,, ,, ,, ,, ,, 7 ,,	40,7	40,9	—	—	—	34,0
,, ,, ,, ,, ,, ,, 28 ,,	43,5	46,3	47,3	47,2	46,7	40,2

Auch in diesem Versuche eine etwas stärker fördernde Wirkung des Ca gegenüber dem Kalium. Dies zeigt sich auch im folgenden Versuche bei denselben Salzkonzentrationen, während bei niedrigeren Normalitäten (n/20 bis n/25 in den entsprechenden Pufferlösungen) das Kalium etwas günstiger als das Ca wirkte.

Versuch 21 (Abb. 15). n/10 KCl und $CaCl_2$. Milchsäurepufferung mit Kaliumlactat bzw. Calciumlactat (p_H 3,9). 20 g Leberbrei mit 100 ccm Pufferlösung. In 5 ccm der Suspension 2,62 mg Gesamt-N und 0,22 mg Rest-N.

Kolben 1: KCl (im Puffer K); 2: $CaCl_2$ (im Puffer Ca); 3: KCl (50 Proz.) + $CaCl_2$ (50 Proz.) (im Puffer K und Ca); 4: KCl (12 Proz.) + $CaCl_2$ (88 Proz.); 5: destilliertes Wasser (im Puffer K); 6: destilliertes Wasser (im Puffer Ca).

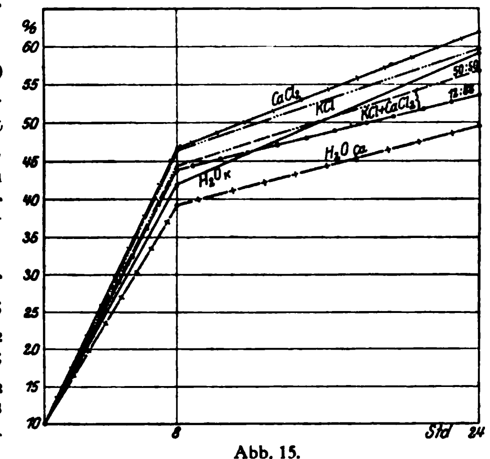


Abb. 15.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 8 Std. . . .	1,21	·1,22	1,16	1,16	1,12	0,99
,, ,, ,, 24 ,, . . .	1,56	1,61	1,48	1,41	1,52	1,31
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 8 Std.	46,3	46,4	44,6	44,4	42,8	38,0
,, ,, ,, ,, ,, ,, 24 ,,	59,6	61,7	56,9	53,7	58,3	49,9

Die Gemische aus den K- und Ca-Salzen zeigen gegenüber dem K und Ca allein keine charakteristischen Wirkungen.

In weiteren Versuchen wurden nun alle drei Ionenarten einzeln und miteinander in verschiedenen Konzentrationen gemischt geprüft. Zwei von diesen Versuchsreihen sollen im Auszuge mitgeteilt werden.

Versuch 22. n/10 NaCl, KCl, $CaCl_2$ (p_H der Suspensionen 3,9). 17,7 g Leberbrei mit 100 ccm Milchsäurepufferlösung. In 5 ccm der Suspension 6,36 mg Gesamt-N und 0,66 mg Rest-N.

Kölbchen 1: NaCl; 2: KCl; 3: $CaCl_2$; 4: NaCl (33,3 Proz.), KCl (33,3 Proz.), $CaCl_2$ (33,3 Proz.); 5: NaCl (92 Proz.), KCl (4 Proz.), $CaCl_2$ (4 Proz.); 6: NaCl (4 Proz.), KCl (92 Proz.), CaCl (4 Proz.); 7: NaCl (4 Proz.), KCl (4 Proz.), $CaCl_2$ (92 Proz.).

Kolben	1	2	3	4	5	6	7
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,80	1,99	2,21	1,95	1,58	1,92	2,05
„ „ „ 28 „	3,42	3,65	3,95	3,50	3,44	3,61	3,65
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N n. 4 Std.	28,3	31,4	34,8	30,8	24,9	30,2	32,3
„ „ „ „ „ „ 28 „	53,8	57,5	62,1	55,2	54,2	56,9	57,4

Auch hier, wie bisher, liegt die Calciumkurve über der Kaliumkurve und diese über der Natriumkurve. Von den vielfachen Gemischen ist das mit viel Na und wenig K und Ca insofern bemerkenswert, als es etwas stärker als die anderen hemmt.

Versuch 23 (Abb. 16). n/10 Na, KCl, $CaCl_2$ (p_H der Suspension 3,9). 10,5 g Leberbrei mit 100 ccm Milchsäurepuffer. In 5 ccm der Suspension 2,95 mg Gesamt-N und $0{,}30_9$ mg Rest-N.

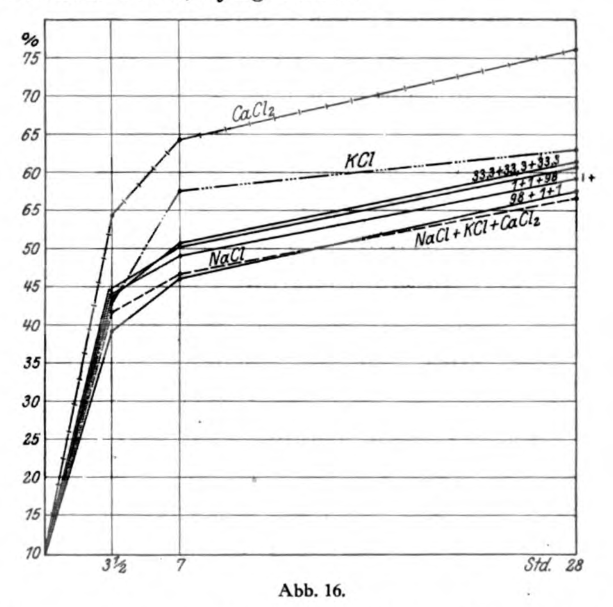


Abb. 16.

Kölbchen 1: NaCl; 2: KCl; 3: $CaCl_2$; 4: NaCl, KCl, $CaCl_2$ (je 33,3 Proz.); 5: NaCl (98 Proz.), KCl (1 Proz.), $CaCl_2$ (1 Proz.); 6: NaCl (1 Proz.), KCl (98 Proz.), $CaCl_2$ (1 Proz.); 7: NaCl (1 Proz.), KCl (1 Proz.), $CaCl_2$ (98 Proz.).

Kolben	1	2	3	4	5	6	7
Rest-N, mg nach 3½ Std.	1,23	1,26	1,61	1,30	1,16	1,29	1,31
„ „ „ 7 „	1,46	1,70	1,91	1,50	1,36	1,45	1,48
„ „ „ 28 „	1,68	1,86	2,26	1,81	1,70	1,76	1,80
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N n. 3½ Std.	41,7	42,5	54,5	43,5	39,3	43,7	44,3
„ „ „ „ „ „ 7 „	49,3	57,6	64,6	50,6	46,1	49,0	50,1
„ „ „ „ „ „ 28 „	56,7	63,0	76,3	61,4	57,7	59,4	61,0

Dieser Versuch deckt sich vollkommen mit den vorhergehenden.

Zusammenfassend läßt sich von den Kationen sagen, daß ihr Anteil (in den geprüften Salzkonzentrationen), wenn auch gering, aber immerhin bemerkbar ist. Und zwar ist die relative Wirksamkeit der untersuchten Kationen abhängig von der Konzentration. In Konzen-

trationen von 1 n bis n/10 geht das Ca-Ion in seiner mehr fördernden oder weniger hemmenden Wirkung dem K-Ion und dieses dem Na-Ion voran. In sehr geringen Konzentrationen (n/20) scheint Na mehr als K, und K mehr als Ca zu fördern. Salz- (Ionen-) Gemische zeigen keine wesentlichen Verschiedenheiten von den einzelnen Salzen. Nur bei viel Na mit wenig K und Ca war die hemmende Wirkung stärker als mit einem der beiden Komponenten.

Anschließende Versuche (Nr. 24 und 25) prüften die Natrium- und Kaliumwirkung abseits vom Optimum bei p_H 5,0. Wie bei den Anionen konnte auch hier eine mehr oder weniger deutliche Umkehr der Wirkung im Vergleich zu den bei optimaler Reaktion beobachtet werden: die Natriumkurve lag über der Kaliumkurve.

Versuch 24 (Abb. 17). n/10 Natriumchlorid und Kaliumchlorid (p_H 5,0). 14 g Leberbrei mit Milchsäurepuffer (Kaliumlactat bzw. Natriumlactat). In 5 ccm der Suspension 4,65 mg Gesamt-N und 0,35 mg Rest-N.

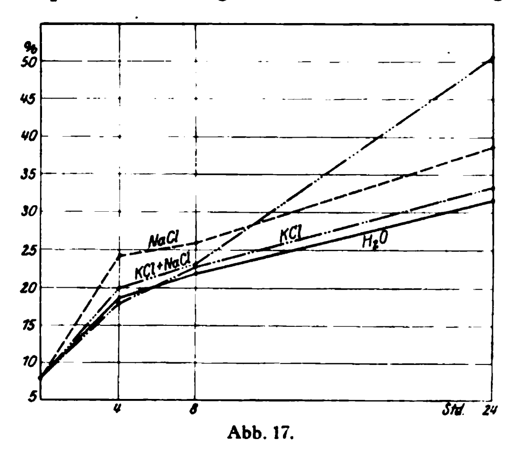


Abb. 17.

Kolben 1: KCl (K im Puffer;) 2: NaCl (Na im Puffer); 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.) (K und Na im Puffer); 4: destilliertes Wasser (Na im Puffer).

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,84	1,13	0,93	0,88
„ „ „ 8 „	1,05	1,21	1,08	1,05
„ „ „ 24 „	1,55	1,80	2,34?	1,50
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	18,0	24,3	20,0	18,9
„ „ „ „ „ „ 8 „	22,5	26,0	23,2	22,7
„ „ „ „ „ „ 24 „	33,4	38,9	50,4?	32,3

Versuch 25 (Abb. 18). n/10 Natriumchlorid und Kaliumchlorid (p_H 5,0). 7 g Leberbrei mit Milchsäurepufferlösung (Natriumlactat bzw. Kaliumlactat). In 5 ccm der Suspension 1,90 mg Gesamt-N und $0,12_6$ mg Rest-N.

Kolben 1: NaCl (im Puffer Na); 2: KCl (im Puffer K); 3: NaCl (50 Proz.) + KCl (50 Proz.) (im Puffer Na und K); 4: destilliertes Wasser (im Puffer Na).

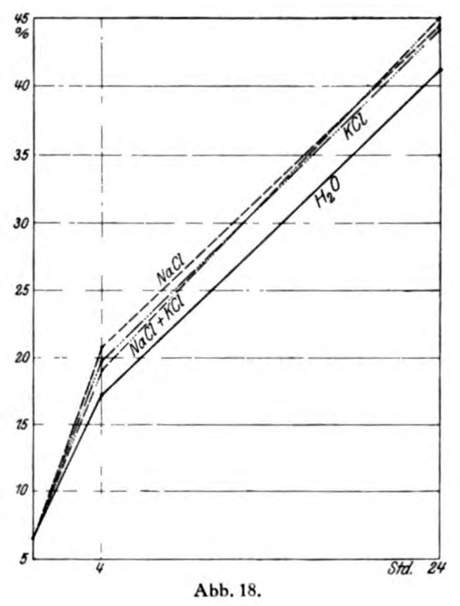


Abb. 18.

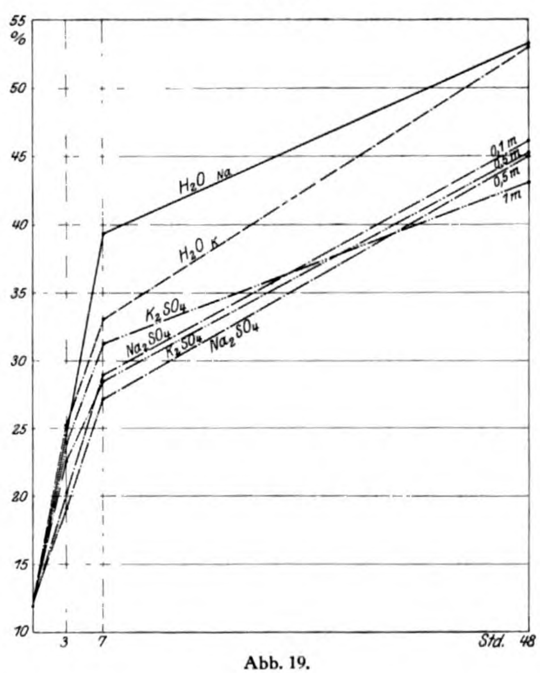


Abb. 19.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,40	0,38	0,37	0,32
„ „ „ 24 „	0,85	0,84	0,85	0,78
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 4 Std.	20,9	19,8	19,6	17,2
„ „ „ „ „ „ 24 „	44,6	44,1	44,9	41,3

In allen bisherigen Kationenversuchen wurden Chloride angewendet. In den folgenden zwei Versuchen wurden Sulfate geprüft.

Versuch 26. (Abb. 19). Natriumsulfat und Kaliumsulfat im Optimum. 21 g Leberbrei mit Milchsäurepuffergemischen. In 5 ccm der Suspension 5,96 mg Gesamt-N und $0{,}75_6$ mg Rest-N.

Kolben 1: Na_2SO_4 (m/2); 2: Na_2SO_4 (1 m); 3: destilliertes Wasser; 4: K_2SO_4 (m/2); 5: K_2SO_4 (1 m); 6: destilliertes Wasser. In den Kolben 1 bis 3: Natriumlactat; in den Kolben 4 bis 6: Kaliumlactat. p_H der Suspensionen 3,80.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,14	1,24	1,46	1,35	1,45	1,51
„ „ „ 7 „	1,62	1,71	2,33	1,70	1,87	1,97
„ „ „ 48 „	2,70	2,74	3,21	2,70	2,53	1,67
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 3 Std.	19,1	20,8	24,5	22,6	24,4	25,3
„ „ „ „ „ „ 7 „	27,0	28,9	39,2	28,5	31,4	33,1
„ „ „ „ „ „ 48 „	45,2	46,0	53,8	45,2	42,5	53,1

Das Überwiegen der Kaliumwirkung (in Hinsicht auf Förderung bzw. geringere Hemmung) gegenüber der Natriumwirkung läßt sich auch aus diesem Versuche deutlich erkennen. Ferner zeigt sich, daß in den niedrigen Konzentrationen der Pufferlösungen (n/25 bis n/30) die Autolyse in Gegenwart von Na schneller verläuft als in Gegenwart von K.

Den zweiten Versuch stellten wir bei einem p_H von 5 an.

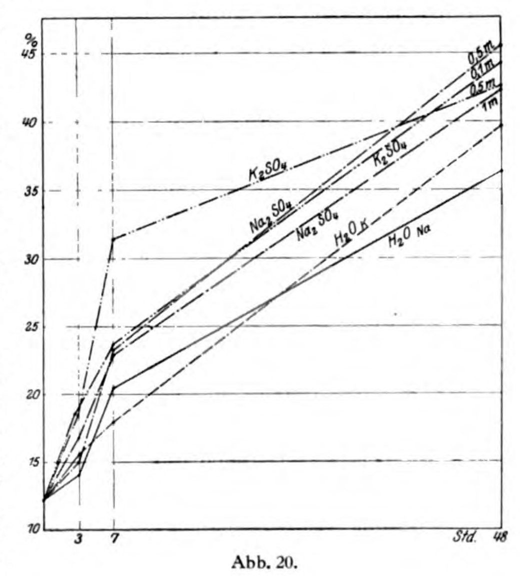


Abb. 20.

Versuch 27. (Abb. 20). Natriumsulfat und Kaliumsulfat bei p_H 5,0. 21 g Leberbrei mit den Milchsäurepufferlösungen. In 5 ccm der Suspension 5,96 mg Gesamt-N und 0,75 mg Rest N.

Kolben 1: Na_2SO_4 (m/2); 2: Na_2SO_4 (1 m); 3: destil-

liertes Wasser; 4: K_2SO_4 (m/2); 5: Na_2SO_4 (1 m); 6: destilliertes Wasser. In 1 bis 3: Natrium-, in 4 bis 6: Kaliumlactat.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 3 Std.	0,89	1,01	0,84	1,05	1,06	0,93
,, ,, ,, 7 ,, ...	1,40	1,39	1,22	1,87	1,42	1,07
,, ,, ,, 48 ,, ...	2,71	2,52	2,18	2,53	2,64	2,36
Rest-N i. Proz. d. Ges.-N n. 3 Std.	15,0	16,9	14,1	17,6	17,7	15,5
,, ,, ,, ,, ,, ,, 7 ,,	23,4	23,3	20,6	31,4	23,8	18,0
,, ,, ,, ,, ,, ,, 48 ,,	45,4	42,3	36,6	42,5	44,3	39,6

Die Umkehr der Totalwirkung (statt Hemmung Förderung) durch Veränderung der Acidität ist auch hier (vgl. die Versuche **3**, **3a** und **4**) deutlich ausgesprochen, während in der Wirkung des K im Vergleich zu Na kein Unterschied gegen den vorigen Versuch zu verzeichnen ist.

Zum Schluß stellten wir noch einige Versuche mit der einwertigen Kationenreihe Na, K, Li, Rb an. Den ersten und zweiten Versuch im Optimum, den dritten bei einem p_H von 5,0.

Versuch 28. (Abb. 21). NaCl, KCl, LiCl, RbCl (p_H 3,70).

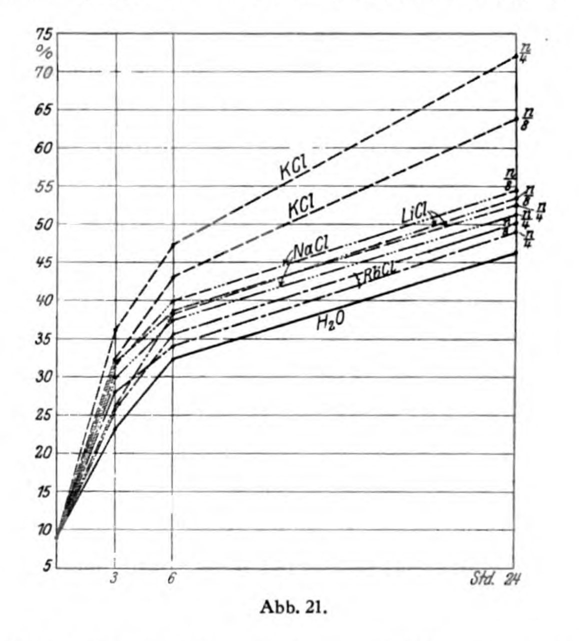


Abb. 21.

Kolben 1: NaCl; 2: KCl; 3: LiCl; 4: RbCl (zu je n/4 Endkonzentration); 5: NaCl; 6: KCl; 7: LiCl; 8: RbCl (zu je n/8 Endkonzentration); 9: destilliertes Wasser. In 5 ccm Suspension $4{,}99_8$ mg Gesamt-N und 0,43 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rest-N, mg nach 3 Std.	1,51	1,81	1,58	1,40	1,61	1,60	1,40	1,31	1,17
„ 6 „	1,88	2,36	1,94	1,69	2,16	1,99	1,93	1,76	1,61
„ 24 „	2,58	3,58	2,64	2,45	3,18	2,73	2,67	2,53	2,23
Rest-N in Proz. des Gesamt-N nach 3 Std.	30,2	36,0	31,4	28,0	32,2	32,1	28,0	26,3	23,4
„ 6 „	37,2	47,6	38,7	34,0	43,2	40,0	38,6	35,3	32,5
„ 24 „	51,8	71,4	52,9	49,0	63,6	54,5	53,5	50,6	46,6

Versuch 29. (Abb. 22). Salze wie im vorhergehenden Versuche. Konzentration n/8 (p_H 3,70). In 5 ccm Suspension 6,02 mg Gesamt-N und 0,51 mg Rest-N.

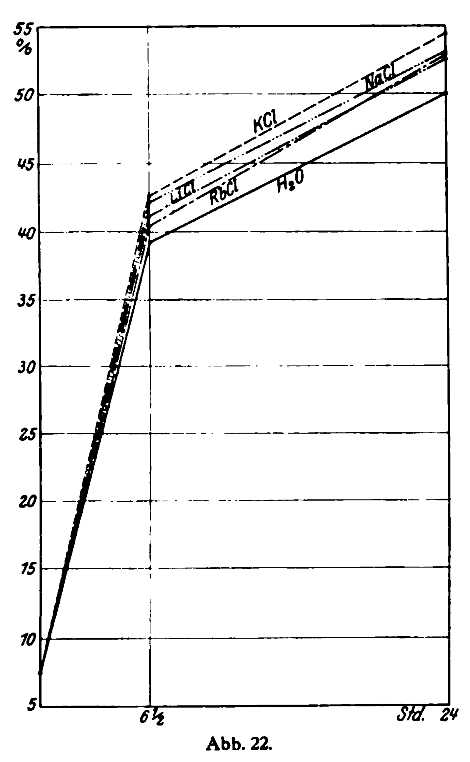


Abb. 22.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach $6^1/_2$ Std.	2,58	2,54	2,49	2,52	2,36
„ „ „ 24 „	3,29	3,20	3,18	3,19	3,01
Rest-N i. Proz. d Gesamt-N n. $6^1/_2$ Std.	42,9	42,9	41,4	40,5	39,2
„ „ „ „ „ „ 24 „	53,2	54,6	52,8	53,0	50,0

Die Versuche zeigen, daß Li und Rb noch weniger fördern als Na.

Versuch 30. (Abb. 23). Salze wie im vorhergehenden Versuche. Konzentration n/4 (p_H 5,0). In 5 ccm Suspension 8,08 mg Gesamt-N, 0,67 mg Rest-N.

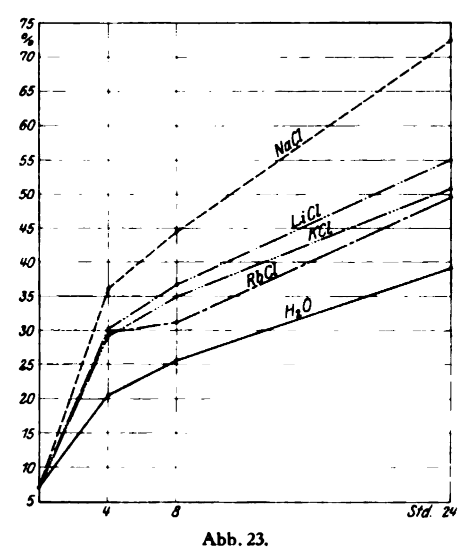


Abb. 23.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	2,93	2,37	2,43	2,39	1,67
„ „ „ 8 „	3,58	2,84	2,76	2,54	2,02
„ „ „ 24 „	5,84	4,20	4,45	4,02	3,19
Rest-N i. Proz. d. Gesamt-N nach 4 Std.	36,3	28,8	30,1	29,5	20,6
„ „ „ „ „ „ 8 „	44,4	35,1	34,1	31,5	25,0
„ „ „ „ „ „ 24 „	72,3	52,0	55,0	49,7	39,4

Auch in diesem Versuch ist die geringe Wirkung des Li und besonders die des Rb ersichtlich.

Zusammenfassung.

1. Die Beeinflussung der Autolyse durch Neutralsalze in der angewandten Konzentration (höchstens 1 n Lösungen) ist, obgleich gering, doch deutlich nachweisbar.

2. Was die Wirkung der Anionen anlangt, so zeigten Versuche mit NaCl, Na_2SO_4, Natriumcitrat in m/2 Konzentration bei optimaler Reaktion (p_H etwa 3,6) deutliche Hemmung. Stark hemmend erwiesen sich unter denselben Bedingungen auch das Tartrat und das Bromid, während das Acetat (stets als Na-Salze) unwirksam war. Bemerkenswerterweise ist bei Änderung der Acidität (p_H 5 bis 6) eine völlige Umkehr der Salzwirkung: Förderung statt Hemmung bei gleichbleibender molarer Konzentration an Salz zu verzeichnen.

3. Von den Kationen wurden hauptsächlich Na, K, Ca als Chloride untersucht. Es zeigt sich, daß bei optimaler Reaktion diese Salze in stärkeren Konzentrationen (1 n bis n/2) die Autolyse hemmen, in schwächeren (n/4 bis n/10) sie fördern. Ein Unterschied zwischen Natrium und Kalium besteht, insofern das Natrium in Konzentrationen von 1 n bis n/2 stärker hemmt, in Konzentrationen von n/4 bis n/10 weniger fördert als das Kalium. Natrium- und Kaliumgemische (wie auch Ca-Gemische) verhalten sich, wie es sich nach der Zusammensetzung der Gemische erwarten läßt; nur das Gemisch von viel Na mit sehr wenig (1 Proz.) K oder Ca war abweichend, da hier eine stärkere Hemmung als bei den einzelnen Salzen zu beobachten war. Das Ca-Ion (1 n bis n/10) ging in seiner mehr fördernden bzw. weniger hemmenden Wirkung dem K-Ion voran. In sehr geringen Konzentrationen (n/20) scheint Na mehr als K, und K mehr als Ca zu fördern.

Abseits des Optimums ($p_H = 5,0$) ist auch hier eine Umkehr der Wirkung im Vergleich zu der bei optimaler Reaktion zu beobachten: die Natriumkurve liegt über der Kaliumkurve.

Wie die Chloride verhalten sich im wesentlichen auch die Sulfate. Li und Rb (n/4 bis n/8) fördern noch weniger als Na.

Untersuchungen über Autolyse. III.

Über Autolyse der Phosphorleber.

Von

P. Rona, E. Mislowitzer und **S. Seidenberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

Mit 14 Abbildungen im Text.

I. Die Änderungen der chemischen Zusammensetzung der Leber eines mit Phosphor vergifteten Tieres betreffen alle Bestandteile, die Eiweißkörper, Kohlehydrate, Fette bzw. Lipoide wie auch die Salze. Um einen genaueren Einblick in das Wesen dieser chemischen Veränderungen zu gewinnen, untersuchten wir die autolytischen Vorgänge in solchen „Phosphorlebern" in der Annahme, daß die dabei behobenen Befunde gewisse Rückschlüsse auf die intravitalen Vorgänge gestatten. In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst nur die Eiweißspaltung bzw. das Verhalten der eiweißspaltenden Fermente berücksichtigt.

Es ist bekannt, daß die intravitale wie auch die postmortale Proteolyse der Leber phosphorvergifteter Tiere erheblich gesteigert ist. Die Frage, ob diese Beschleunigung und Vermehrung der Spaltung auf einer direkten Beeinflussung der eiweißspaltenden Fermente (etwa im Sinne einer „Aktivierung" oder einer Neubildung) beruht oder aber der Phosphor nur indirekt in der Schaffung günstigerer Wirkungsbedingungen für das Ferment wirkt, war einer experimentellen Prüfung zugänglich. Von den wesentlichen Faktoren, die die autolytische Eiweißspaltung beeinflussen, haben wir die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration des Systems, ferner die physiologisch wichtigen Salze kennengelernt. Soll die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration für die Beschleunigung der Phosphorautolyse von ausschlaggebender Bedeutung sein, so muß sie in dem autolysierenden Phosphorleberbrei eine wesentlich höhere sein als in dem Leberbrei bei gewöhnlicher Autolyse. Auf Grund der Untersuchungen von *A. Koehler*, *E. Severinghaus* und *H. C. Bradley*[1]; wie

[1] *A. Koehler*, *E. Severinghaus* und *H. C. Bradley*, Journ. of biol. Chem. 50, XV, 1922.

auch unserer eigenen sind wir über die Aciditätswerte bei der gewöhnlichen Autolyse gut unterrichtet. *Koehler*, *Severinghaus* und *Bradley* konnten feststellen, daß wenige Minuten nach dem Herstellen eines Breies aus der Leber eines unmittelbar vorher getöteten Tieres eine Aciditätsvermehrung eintritt. Während das p_H in der lebenden Leberzelle von ihnen mit ungefähr 7,2 angenommen wird, erhielten sie in dem frischen Brei mit Regelmäßigkeit ein p_H von 6,9 bis 6,8. Im Laufe der Autolyse kommt es durch Säurebildung zu einer weiteren Erhöhung der Acidität des Breies bis auf ein p_H von 6,5 bis 6,6, dann aber wieder zu einer mäßigen Verringerung auf ein p_H von 6,7, um bei diesem Punkte stehen zu bleiben. Wir selbst haben in früheren Untersuchungen durch zahlreiche elektrometrische Messungen, die wir anläßlich unserer Autolysestudien systematisch durchgeführt haben, feststellen können, daß die p_H-Werte des autolysierenden Leberbreies den von den erwähnten Autoren angegebenen Zahlen entsprechen. Zwei dieser Messungen seien hier mitgeteilt.

1	Stunden der Autolyse	6	25	30	50	72
	p_H	6,60	7,00	6,88	6,58	6,66
2	Stunden der Autolyse	1	7	26	96	
	p_H	6,74	6,59	6,66	6,77	

Eine Vergrößerung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration über den angegebenen Punkt hinaus ließ sich in keinem Falle nachweisen. Wir werden also p_H-Werte, die kleiner sind als 6,5, als von der Norm abweichend ansehen dürfen.

In der folgenden Tabelle sind nun die elektrometrisch gefundenen Werte für p_H im Verlaufe der Phosphorautolyse wiedergegeben.

1	Stunden der Autolyse	0		2		4		24		52	
	p_H	7,11		6,82		6,80		6,38		6,12	
2	Stunden der Autolyse	2		4		6		25		50	
	p_H	6,38		6,40		6,35		6,30		6,08	
3	Stunden der Autolyse	0	3	6	27	51	76	97	122	170	194
	p_H	7,05	6,80	6,80	6,53	6,36	6,03	6,03	5,82	5,58	5,52
4	Stunden der Autolyse	0	4	25	73	96	120	142			
	p_H	6,90	6,60	6,16	6,00	5,90	5,85	5,76			
5	Stunden der Autolyse	0		3		5		24			
	p_H	6,86		6,26		6,00		5,97			

Aus diesen Zahlen ist zu ersehen, daß die Aciditätsverhältnisse in dem Leberbrei nach der Phosphorvergiftung erheblich von den oben als normal bezeichneten abweichen. In den meisten Versuchen trat schon wenige Stunden nach Beginn der Autolyse eine sehr starke Säuerung ein, die immer mehr und mehr zunahm. Die endgültig erreichten p_H-Werte bewegten sich zwischen 5,50 und 6,00. Die proteo-

lytischen Fermente befinden sich demnach in dem Brei der Phosphorleber in einer viel günstigeren H˙-Ionenkonzentration[1]) als in der Norm, und ihre Wirksamkeit wird entsprechend erhöht. Hierzu tritt möglicherweise die günstige Beeinflussung der Fermentwirkung durch die an-

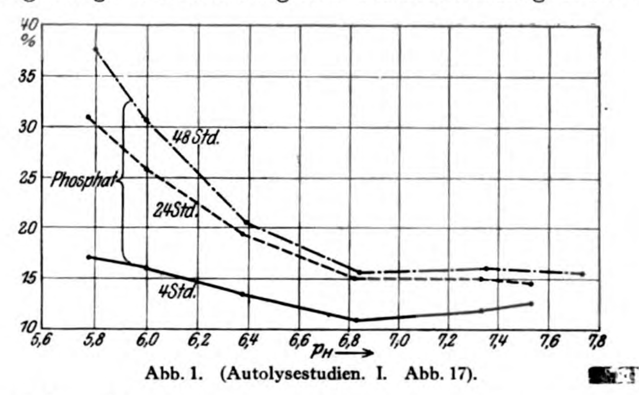


Abb. 1. (Autolysestudien. I. Abb. 17).

wesenden Salze. Stützen wir uns auf das vorhandene, zum Teil bereits vor längerer Zeit beigebrachte Analysenmaterial[2]), so ist die Annahme, daß in der Phosphorleber der Gehalt an Ca und Phosphat höher ist als in der normalen, allem Anschein nach berechtigt. Eigene Untersuchungen[3]) hatten gerade für das Ca und das Phosphat einen stark beschleunigenden Einfluß auf die Proteolyse ergeben. Schon bei niedrigen Phosphatkonzentrationen ließen sich bei einem p_H von 5,8, 6,1, 6,4 Spaltungswerte erzielen, die wesentlich höher lagen als die sonst bei denselben H˙-Ionenkonzentrationen bei Gegenwart anderer Puffer zu erhalten waren (vgl. hierzu die Abb. 1 und 2). Das Calcium fördert nach unseren Untersuchungen von den drei Kationen Na, K und Ca am stärksten, eine Vermehrung des Ca dürfte also ebenfalls zu einer Beschleunigung der Autolyse beitragen.

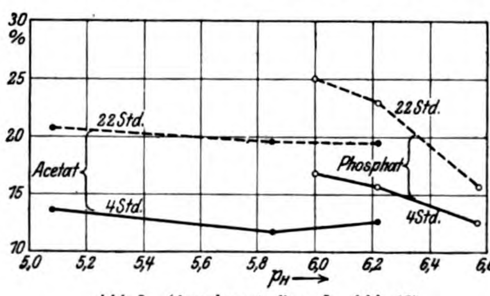


Abb 2. (Autolysestudien. I. Abb. 18).

Wir können also zwanglos die gesteigerte Eiweißspaltung bei der Phosphorautolyse auf die Änderung der Umgebung zurückführen und bedürfen nicht anderer hypothetischer Erklärungsmöglichkeiten. Wenn

[1]) Vgl. I. Mitteilung. Vgl. hierzu auch *E. L. Severinghaus*, Journ. of biol. Chem. **57**, 191, 1923.

[2]) Vgl. unter anderen *M. Kochmann*, Pflügers Arch. **119**, 417, 1907.

[3]) Siehe vorige Mitteilung.

aber diese Annahme richtig ist, so müssen die bei der Autolyse der Phosphorleber erhaltenen Spaltungswerte den normalen sehr ähnlich werden, falls man den wesentlichen Faktor für die Beschleunigung, die Vermehrung der H˙-Ionen, hintanhält. Dies gelingt durch Anwendung geeigneter Puffergemische.

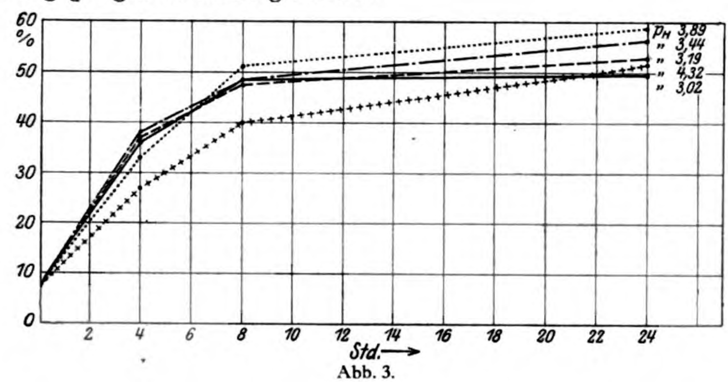


Abb. 3.

Die dabei angewandte Methode war dieselbe wie in den früheren Versuchen. Wir teilen zunächst Versuche mit der gepufferten Autolyse, also mit konstanter H˙-Ionenkonzentration mit.

Versuch 1 (Abb. 3 u. 4). 26. Mai 1923. Meerschweinchen, 530 g. Subkutane Injektion von 0,4 ccm einer 1 proz. Lösung von Phosphor in Paraff. liq. 29. Mai. Das Tier wird durch Halsschnitt getötet (Gewicht kurz vor dem Tode 460 g). Die Leber wird steril entnommen; makroskopisch wie mikroskopisch zeigt sie die Veränderungen einer Phosphorleber. Mit einem Latapie wird ein Brei hergestellt, der Brei (12 g) mit 100 ccm destillierten Wassers zu einer gleichmäßigen Suspension aufgeschwemmt. Es werden mit gleichen Mengen dieser Suspension und Milchsäurepuffergemischen fünf Portionen von folgendem p_H hergestellt:

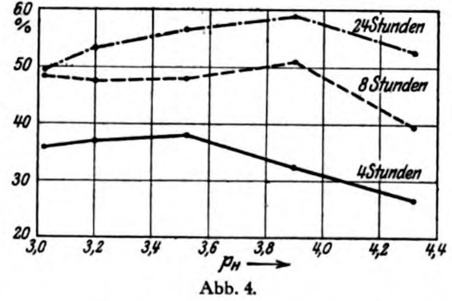
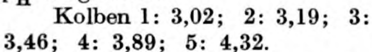


Abb. 4.



Kolben 1: 3,02; 2: 3,19; 3: 3,46; 4: 3,89; 5: 4,32.

Gesamt-N der Suspension in 5 ccm 7,22 mg, Anfangs-Rest-N $0,58_8$ mg, d. h. 8,14 Proz. des Gesamt-N.

	Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg	nach 4 Std.	$2,59_9$	2,66	$2,74_7$	2,36	$1,95_7$
	" 8 "	3,51	3,45	3,47	3,67	2,85
	" 24 "	3,57	3,85	4,07	4,28	3,81
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 4 Std.	36,0	36,8	38,0	32,7	27,1
	" 8 "	48,6	47,7	48,0	50,8	39,5
	" 24 "	49,5	53,2	56,3	59,2	52,7

Versuch 2 (Abb. 5 u. 6). 2. Juni 1923. Meerschweinchen, 645 g. Subkutane Injektion von 0,5 ccm einer 1proz. Phosphorlösung in Paraffin. 6. Juni. Gewicht des Tieres 600 g. Tötung. Gewicht des Leberbreies 16,5 g;

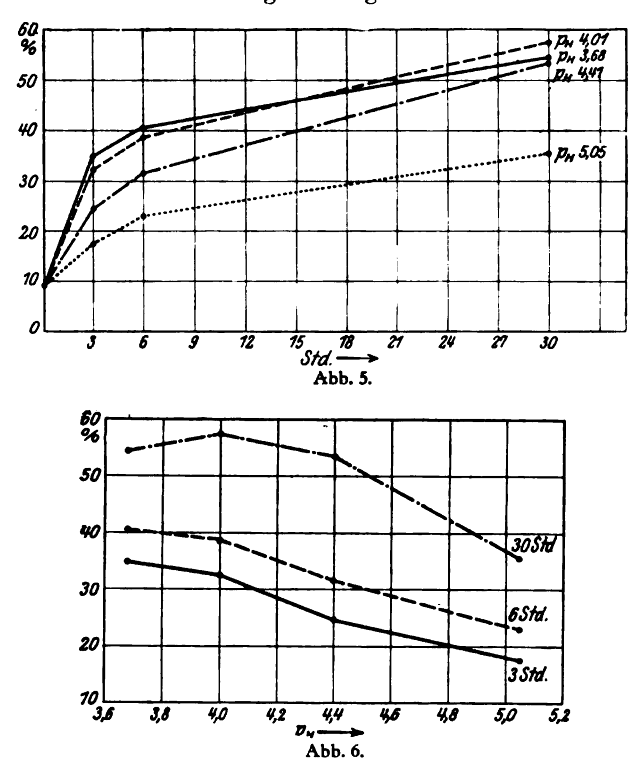


Abb. 5.

Abb. 6.

mit 100 ccm destillierten Wassers Suspension. Mit Milchsäurepuffergemisch werden vier Portionen von folgendem p_H hergestellt:

Kolben 1: 3,68; 2: 4,01; 3: 4,41; 4: 5,05.

Gesamt-N der Suspension für je 5 ccm 9,64 mg. Anfangs-Rest-N 0,929 mg (9,63 Proz.).

	Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg	nach 3 Std.	3,37	3,14	2,38	1,70
	„ 6 „	3,93	3,74	3,06	2,11
	„ 30 „	5,28	5,54	5,16	3,44
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 3 Std.	34,9	32,5	24,6	17,6
	„ 6 „	40,7	38,8	31,6	22,9
	„ 30 „	54,7	57,4	53,4	35,7

Versuch 3 (Abb. 7 u. 8). 22. Juni 1923. Meerschweinchen. Subkutane Injektion von 0,4 ccm einer 1proz. Lösung von Phosphor in Paraffin. 26. Juni. Tötung. Gewicht des Leberbreies 24,0 g. Mit 135 ccm destillierten Wassers Suspension. Mit Milchsäurepuffergemisch werden fünf Portionen von folgendem p_H hergestellt:

Kolben 1: 3,07; 2: 3,19; 3: 3,51; 4: 3,95; 5: 4,40.

Gesamt-N der Suspension für je 5 ccm 7,89 mg, Anfangs-Rest-N 0,91$_3$ mg (11,6 Proz.).

	Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg	nach 3 Std.	2,04	1,89$_8$	1,93	1,63	1,62$_5$
	„ 6 „	2,48	2,51	2,66	2,31	2,30
	„ 53 „	2,64	2,75	3,39	3,32	2,52
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 3 Std.	25,9	24,0	24,5	20,6	20,6
	„ 6 „	31,2	31,8	33,7	29,3	29,2
	„ 53 „	33,4	34,9	43,0	42,0	31,9

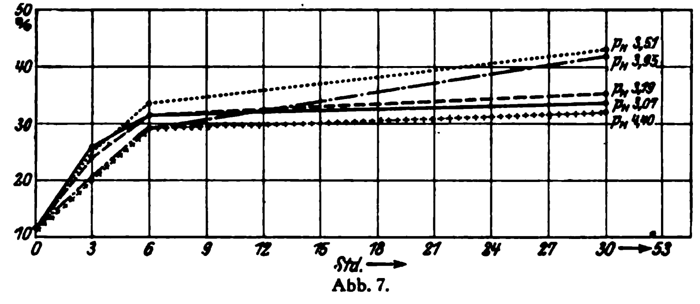


Abb. 7.

Die eben mitgeteilten drei Versuche bewegen sich in dem für die Spaltung optimalen Gebiete der H˙-Ionenkonzentration. Die beobachteten Spaltungswerte stimmen völlig mit denen überein, die wir bei unseren Studien über die Autolyse der normalen Leber kennengelernt haben. Unterschiede in dem Grade und der Geschwindigkeit der Eiweißspaltung bei der Phosphorleber gegenüber der normalen Leber wurden nicht gefunden.

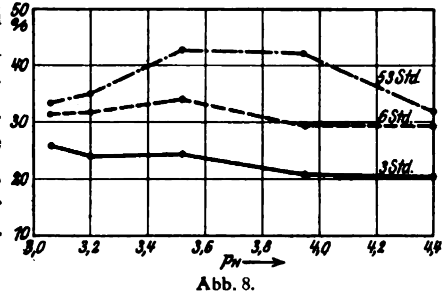


Abb. 8.

Versuch 4 (Abb. 9 u. 10). Meerschweinchen, 600 g. 30. Juni 1923. Subkutane Injektion von 0,4 ccm der 1 proz. Phosphorlösung. 4. Juli. Gewicht

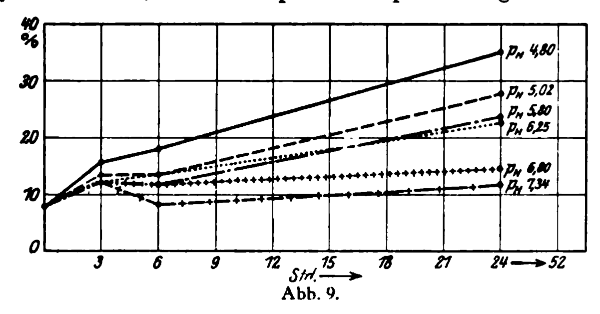


Abb. 9.

des Tieres 450 g. Tötung. Gewicht des Leberbreies 12,5 g. Mit 150 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Mit Acetat- und Phosphatpuffer lösungen wurden je drei Portionen mit folgendem p_H hergestellt:

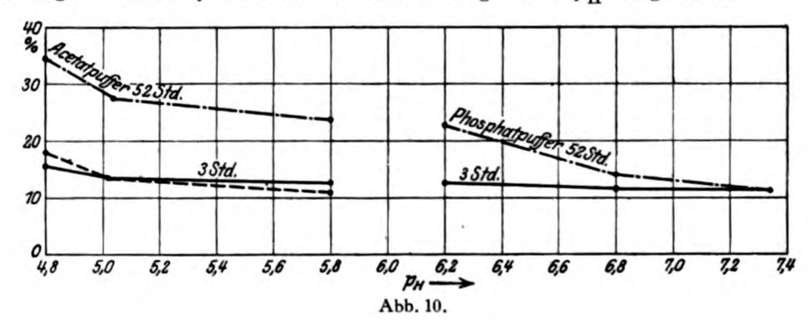


Abb. 10.

Kolben 1: 4,80; 2: 5,02; 3: 5,80 (1 bis 3: Acetatpuffer); 4: 6,25; 5: 6,80; 6: 7,34 (4 bis 6: Phosphatpuffer).

Gesamt-N für je 5 ccm 7,03 mg, der Rest-N 0,57 mg (8,15 Proz.).

	Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg	nach 3 Std.	1,13	0,94	0,87	0,91	0,83	$0,80_6$
	„ 6 „	1,27	0,95	0,79	—	—	0,58
	„ 52 „	2,46	1,96	1,69	1,62	1,01	0,80
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 3 Std.	16,1	13,3	12,4	12,9	11,8	11,4
	„ 6 „	18,0	13,5	11,3	—	—	8,3
	„ 52 „	35,0	27,9	24,0	23,0	14,4	11,4

Versuch 5 (Abb. 11 u. 12). Meerschweinchen, 565 g. 7. Juli 1923. Injiziert 0,45 ccm der 1 proz. Phosphorlösung. 10. Juli. Gewicht 500 g. Tötung. Gewicht des Leberbreies 16,0 g. Mit 160 ccm destillierten Wassers zur Suspension.

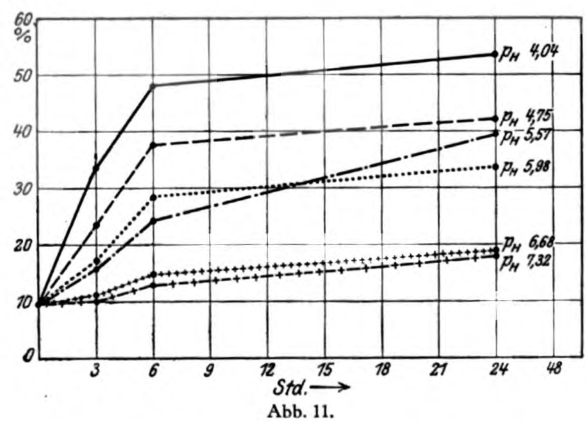


Abb. 11.

p_H im Kolben 1: 4,04; 2: 4,75; 3: 5,57 (1 bis 3: Acetatpuffer); 4: 5,98; 5: 6,68; 6: 7,32 (4 bis 6: Phosphatpuffer).

Gesamt-N in 5 ccm der Suspension 5,11 mg, Rest-N 0,48 mg (9,4 Proz.).

Kolben		1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg	nach 3 Std.	1,71	1,20	0,82	0,88	0,55	0,52
	„ 6 „	2,46	1,91	1,23	1,46	0,76	0,67
	„ 48 „	2,75	2,15	2,02	1,71	0,96	0,93
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 3 Std.	33,4	23,6	15,9	17,2	10,7	10,2
	„ 6 „	48,1	37,4	24,2	28,6	14,8	13,1
	„ 48 „	53,5	42,0	39,5	33,5	18,8	18,2

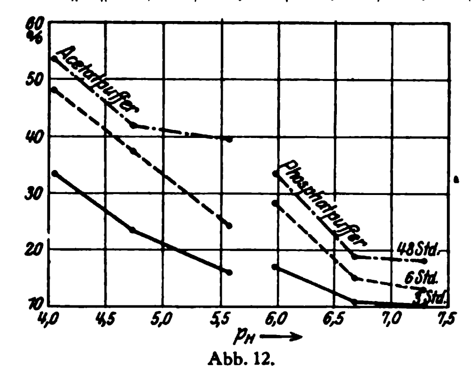


Abb. 12.

Versuch 6 (Abb. 13 u. 14). Meerschweinchen, 460 g. 13. Juli 1923. Injiziert 0,8 ccm der 1 proz. Phosphorlösung. 16. Juli. Gewicht 390 g. Tötung. 17,0 g Leberbrei mit 180 ccm destillierten Wassers zur Suspension.

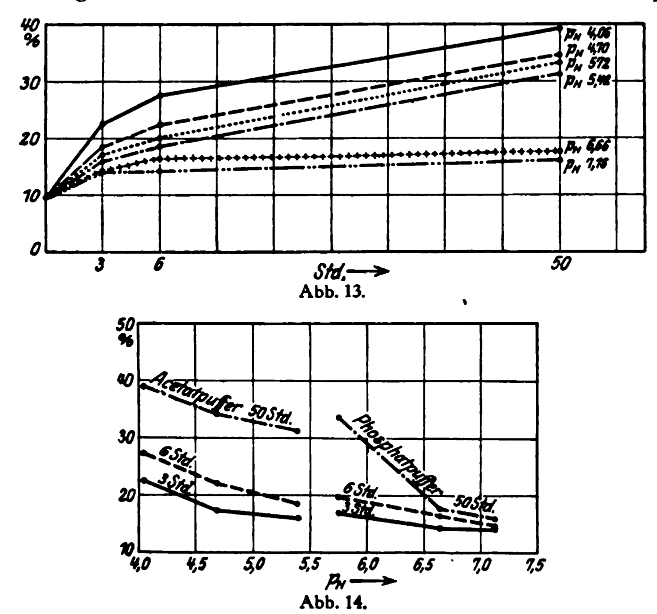


Abb. 13.

Abb. 14.

p_H im Kolben 1: 4,06; 2: 4,70; 3: 5,42 (1 bis 3: Acetatpuffer); 4: 5,74; 5: 6,66; 6: 7,16 (4 bis 6: Phosphatpuffer).

Gesamt-N der Suspension in 5 ccm 5,62 mg, Rest-N 0,54 mg (9,6 Proz.).

	Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg	nach 3 Std.	1,27	1,04	0,89	0,95	0,81	0,82
	„ 6 „	1,55	1,25	1,05	1,11	0,93	0,82
	„ 50 „	2,21	1,94	1,75	1,89$_8$	0,99	0,89$_8$
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 3 Std.	22,6	18,4	16,0	16,9	14,4	14,6
	„ 6 „	27,6	22,2	18,7	19,8	16,5	14,5
	„ 50 „	39,4	34,5	31,2	33,7	17,7	15,9

Auch in diesen drei letzten, nicht im optimalen $H^{\cdot}$-Konzentrationsgebiete verlaufenden Versuchen läßt sich eine Abweichung gegen die Autolyse in der normalen Leber nicht beobachten. Die Werte, die bei den Phosphorlebern gewonnen wurden, liegen durchaus in der von der normalen her bekannten Größenordnung.

II. Weitere Versuche sollten darüber Aufschluß geben, ob die Zusammensetzung des Reststickstoffs bei der Autolyse der Phosphor- und der normalen Leber voneinander abweichen oder nicht. Zu diesem Zwecke wurde außer dem Gesamtstickstoff noch die „Aminosäuregruppe“ bestimmt[1]), und zwar wie in der früheren Arbeit nach der mikrokolorimetrischen Methode von *Folin*.

Versuch 7. Meerschweinchen, 750 g. 17. Juli 1923. Subkutane Injektion einer 1proz. Phosphatlösung. 20. Juli. Gewicht 680 g. Tötung. 33 g Leberbrei mit 150 ccm destillierten Wassers.

p_H im Kolben 1: 3,81 (Acetatpuffer); 2: 5,61 (Phosphatpuffer); 3: 7,08 (Phosphatpuffer).

Gesamt-N der Suspension in 5 ccm 8,26 mg, Anfangs-Rest-N 1,26 mg (15,2 Proz.).

	Kolben	1	2	3
Rest-N, mg	nach 4 Std.	2,65	1,53	1,27
	„ 24 „	4,51	3,04	1,68
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 4 Std.	32,1	18,5	15,3
	„ 24 „	54,6	36,8	20,8

Der Aminosäurengehalt wurde in Kolben 1 und 3 nach 24 Stunden der Autolyse bestimmt.

Kolben 1: Gesamtrest-N 4,51 mg, Amino-N 2,28 mg (50,7 Proz.).

Kolben 2: Gesamtrest-N 1,68 mg, Amino-N 1,68 mg (100 Proz.).

Versuch 8. Meerschweinchen, 750 g. 23. Juli 1923. Subkutane Injektion von 1,0 ccm einer 1proz. Phosphorlösung. 26. Juli. Gewicht 650 g. Tötung. 18 g Leberbrei mit 150 ccm destillierten Wassers zur Suspension. In 5 ccm Gesamt-N 7,95 mg, Anfangs-Rest-N 0,60 mg (7,74 Proz.).

p_H im Kolben 1: 3,93 (Milchsäurepuffer); 2: 5,78 (Phosphatpuffer); 3: 7,00 (Phosphatpuffer).

[1]) Vgl. hierzu auch *J. Desqueyroux*, C. r. soc. biol. 86, 143, 1922.

	Kolben	1	2	3
Rest-N, mg	nach 4 Std.	1,89	1,28	0,98
	„ 7 „	2,45	1,28	0,99
	„ 24 „	3,52	2,04	1,07
Rest-N in Proz. des Gesamt-N	nach 4 Std.	23,8	16,1	12,3
	„ 7 „	30,9	16,1	12,5
	„ 24 „	44,2	25,7	13,4

Die Amino-N-Werte waren die folgenden:

	Kolben	1	2	3
In mg	nach 4 Std.	$0{,}42_4$	$0{,}45_6$	$0{,}53_6$
	„ 7 „	0,67	$0{,}79_8$	0,48
	„ 24 „	$0{,}92_4$	$1{,}05_6$	0,52
In Proz. des Rest-N	nach 4 Std.	22,0	35,5	54,8
	„ 7 „	27,2	62,1	48,0
	„ 24 „	26,2	51,0	53,0

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß der Abbau bei der Autolyse von Phosphorlebern bedeutend weiter geht als bei der normalen Autolyse. Während dort der Amino-N höchstens 25 bis 30 Proz. des gesamten Rest-N betrug, finden wir hier 50 Proz. und darüber hinaus. Und zwar geht die Aufspaltung des Eiweißes im alkalischen Gebiete weiter als im sauren. Hier liegen Anhaltspunkte für das Ineinandergreifen mehrerer Fermentarten vor, wobei anscheinend die Wirksamkeit des tiefer abbauenden Ferments (oder der Fermentgruppe) der vorhergehenden Spaltung bis zu einer höheren Stufe bedarf.

Zusammenfassung.

1. In dem autolysierenden Brei der Phosphorleber finden die proteolytischen Fermente günstigere Wirkungsbedingungen als bei der normalen Autolyse. Der wesentliche Faktor hierbei ist die vermehrte H˙-Ionenkonzentration. Wird diese durch geeignete Puffer konstant auf einem niedrigeren oder höheren Wert gehalten, so ist in dem Ausmaß der Eiweißspaltung in der Phosphorleber gegenüber der normalen Leber kein Unterschied.

2. Der Grad des Abbaues der Eiweißkörper ist bei der Autolyse der Phosphorleber jedoch — in Übereinstimmung mit den Befunden früherer Forscher — tiefer als bei der normalen: die Werte des Aminostickstoffs sind bedeutend höher als bei der normalen Autolyse.

Über die Kolloide im Harn und im Blut.

Von

J. Wohlgemuth und T. Koga (Osaka, Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 13. Januar 1924.)

Die Eigenschaft, beim Schütteln stark zu schäumen, zeigen in hohem Maße alle tierischen und menschlichen Sekrete und Exkrete, und es ist eigentlich verwunderlich, daß bisher dieses Phänomen noch nicht näher untersucht worden ist. A priori konnte man annehmen, daß diese Eigenschaft in erster Reihe geknüpft ist an die kolloiden Bestandteile dieser Flüssigkeiten, und daß das Studium der Schaumbildung interessante Aufschlüsse über den Charakter und vielleicht auch die Menge der Kolloide geben könnte. Ein besonders interessantes Objekt in dieser Beziehung schien uns der Harn zu sein, den man sich, wenn wir von den Salzen absehen, in der Hauptsache aus Wasser und lyophilen Kolloiden zusammengesetzt denken muß. Da er ein Produkt der Nierenfunktion ist, so war es nicht unwahrscheinlich, daß Störungen derselben schon ganz geringer Natur, die an sich noch keine Ausscheidung von Eiweiß zu bedingen brauchen, sich durch Änderungen im Charakter und in der Konzentration der Kolloide dokumentieren konnten.

Dieses Studium setzt aber eine Methodik voraus, die es gestattet, die Menge der Kolloide quantitativ zu messen. Ein solches Verfahren existierte aber bis heute noch nicht, und man darf wohl auch das als den Grund ansehen, weshalb dieses interessante Problem, das im stillen gewiß schon manchen Biologen beschäftigt hat, bisher noch unbearbeitet geblieben ist. Von der Überlegung ausgehend, daß in erster Reihe die Menge der Kolloide die Stärke der Schaumbildung einer Lösung bedingt, so zwar, daß eine an Kolloiden reiche Lösung beim Schütteln stark schäumt, eine an Kolloiden arme nur schwache Schaumbildung zeigt, haben wir ein einfaches Verfahren ausgearbeitet, mit dessen Hilfe wir in kurzer Zeit imstande sind, den Grad der Schaum-

bildung festzustellen. Bevor wir aber hierauf näher eingehen, möchten wir einige kurze Bemerkungen rein theoretischer Natur über die Schaumbildung vorausschicken.

Schäume sind aufzufassen als disperse Systeme, deren disperse Phase gasförmig ist, während das Dispersionsmittel fest oder flüssig sein kann, Da wir es bei den tierischen Flüssigkeiten nur mit letzteren zu tun haben. können wir von Schäumen mit festen Dispersionsmitteln absehen. Für die Schaumbildung kommen nach *Quincke* nur Lösungen, nicht aber homogene Flüssigkeiten in Betracht, und zwar schäumen nur solche wässerige Lösungen, bei denen die Oberflächenspannung des Wassers durch die gelösten Stoffe erniedrigt wird. Hieraus folgt, daß die Schaumbildung nur dann zustande kommen kann, wenn die Möglichkeit gegeben ist, daß sich in der Lösung — beispielsweise beim Schütteln — Grenzflächenschichten bilden, deren Zusammensetzung von der der Lösung wesentlich verschieden ist, mit anderen Worten, wenn sich durch irgendwelche mechanischen Maßnahmen die Bildung einer *Gibbs*schen Schicht vollzieht. In seiner berühmten Arbeit „Über das Gleichgewicht heterogener Substanzen" leitete *Gibbs*[1]) das Prinzip ab, daß ein gelöster Stoff, der die Oberflächenspannung seines Lösungsmittels vermindert, das Bestreben hat, sich an der Oberfläche anzusammeln. So neigt die Konzentration der Oberflächenschicht dazu, größer zu werden als die der Lösung im Innern. Ein solcher Vorgang würde ersichtlich nicht unbegrenzt fortschreiten. Er strebt vielmehr einem Gleichgewicht zwischen der Oberflächenspannung, die den gelösten Stoff auf die Oberfläche ziehen will, und dem osmotischen Druck zu, der bestrebt ist, ihn gleichförmig durch das ganze Lösungsmittel zu verteilen. Unter den gegebenen Umständen würde aber ein Gleichgewicht ein bestimmtes Verhältnis zwischen der Konzentration in der Oberflächenschicht und der im Innern der Lösung bedeuten. Die Gültigkeit dieses Gesetzes wies *Ramsden*[2]) auch für kolloidal gelöste Stoffe nach. Er konnte zeigen, daß die an der Oberfläche sich ansammelnden Kolloidteilchen dort zähe, elastische Häutchen bilden, und daß diese für die Bildung eines haltbaren Schaumes von großer Bedeutung sind. Diese festen Teilchen, welche die Oberflächenenergie der freien Oberfläche herabsetzen, können in dreifacher Weise zur Beständigkeit eines Schaumbläschens beitragen:

1. indem sie als Stützpunkt dienen,
2. durch tatsächliche Berührung, Reibung oder Kohäsion der Teilchen, die örtlichen Verschiebungen im Häutchen entgegenwirken,
3. dadurch, daß sie sich einer solchen Deformation widersetzen, die dahin zielt, eine neue Oberfläche mit höherer Oberflächenspannung zu bilden.

Es ist klar, daß, wenn es sich, wie bei Albumosen und Peptonen, um solche Kolloide handelt, die. wie *Metcalf*[3]) gezeigt hat, ein Häutchen bilden, diese einmal eingetretene Gelbildung dem osmotischen Druck einen großen Widerstand entgegensetzt, so daß das Konzentrationsgefälle zwischen der Oberflächenschicht und der Lösung ein außerordentlich steiles bleibt. Aber auch wenn es sich um lyophile Kolloide handelt, die sich in der Grenzschicht nicht zu einem festen Häutchen zusammenschließen, sondern nur vermöge Reibung oder Kohäsion sich aneinander-

---

[1]) *Gibbs*, Trans. Conn. Acad. 3, 108, 343, 1876.

[2]) *W. Ramsden*, Zeitschr. f. physikal. Chem. 47, 336, 1904.

[3]) *W. V. Metcalf*, ebendaselbst 47, 336, 1904.

lagern und so einem Übertritt aus der Grenzschicht in die Lösung kraftvoll widerstreben, kann das Konzentrationsgefälle ein sehr steiles sein. Sehr wahrscheinlich steht nun das Auftreten eines Optimums der Schaumbildung mit diesen Vorgängen in engem Zusammenhang. Denn die Grundbedingung für das Zustandekommen eines Schaumes ist zu suchen in dem Vorhandensein einer Divergenz zwischen der Konzentration des gelösten Stoffes in der Grenzflächenschicht und der in der Lösung selber.

Die Schäume kolloidaler Flüssigkeiten haben wir nun aufzufassen als dreiphasige Systeme; denn das Dispersionsmittel selbst repräsentiert ein zweiphasiges System insofern, als in der Flüssigkeit der kolloide Stoff gelöst ist, während das Gas bzw. die Luft die dritte Phase bildet. Beim Schütteln solcher Lösungen sammeln sich die Kolloide in der Grenzflächenschicht (*Gibbs*schen Schicht) gleichsam als feste Phase an und verleihen ihr vermutlich eine um so größere Stabilität, in je größerer Konzentration sie sich dort anhäufen. Wir können also umgekehrt aus der Stabilität des Schaumes in erster Annäherung auf die Menge der Kolloide schließen. Daraus folgt weiter, daß, wenn man eine kolloidale Lösung verdünnt, die Schaumbildung schwächer werden muß, und daß schließlich bei genügend starker Verdünnung die Kolloidteilchen in so geringer Zahl in der Lösung vorhanden sind, daß beim Schütteln dieser Lösung ihre Konzentration in der Grenzschicht nur um ein Weniges oder überhaupt nicht die Konzentration in der Lösung selbst überwiegt, so daß schließlich eine Schaumbildung gänzlich ausbleibt.

Von dieser Überlegung ausgehend, wählten wir als Maß für den Gehalt einer Lösung an Kolloiden den Grad der Verdünnung, der erforderlich war, um die Lösung ihrer Eigenschaft, einen haltbaren Schaum zu bilden, zu berauben. Je größer die Verdünnung war, die wir anwenden mußten, um die Schaumbildung zum Verschwinden zu bringen, um so größer müßte danach unter vergleichenden Bedingungen der Gehalt dieser Lösung an Kolloiden sein.

I. Urin.

Für unsere Versuche verwandten wir zunächst menschlichen Urin.

Wir gingen dabei so vor, daß wir auf eine Reihe von Reagenzgläsern von gleicher Höhe und Weite je 10 ccm Urin in absteigenden Verdünnungen verteilten, also ins erste Gläschen 10 ccm nativen Urin, ins zweite 10 ccm der zweifachen Verdünnung, ins dritte 10 ccm der vierfachen, ins vierte 10 ccm der achtfachen, ins fünfte 10 ccm der 16fachen Verdünnung usf., und nun jedes Gläschen verschlossen mit der Hand schüttelten. Um möglichst gleichmäßig zu arbeiten, schüttelten wir mit kräftiger Bewegung jedes Gläschen 60mal, stellten es in das Reagenzglasgestell zurück und kontrollierten die Schaumbildung. Anfänglich hatten wir für unsere Versuche 100maliges Schütteln angewandt; wir überzeugten uns aber später, daß 60maliges Hin- und Herschütteln den gleichen Effekt hat. Eine geringere Zahl von Schüttelbewegung hat sich uns nicht als zweckmäßig erwiesen.

Das Schütteln selbst führten wir so aus, daß wir je ein verschlossenes Gläschen in die rechte und linke Hand nahmen und nun in schnellem Tempo mit dem Unterarm in etwa senkrechter Richtung möglichst kräftige Schüttelbewegungen machten. Eine Messung der Schaumhöhe vorzunehmen, schien uns nicht so geeignet, wie die Feststellung derjenigen Verdünnung, bei der noch eben ein geringer Schaum nach dem Schütteln bestehen blieb. Man kommt auf diesem Wege zu ganz einheitlichen Resultaten.

Wenn man eine Lösung kräftig schüttelt, so daß eine innige Durchmischung der Flüssigkeit mit der Luft vor sich geht, so schäumt fast jede Lösung. Sobald man aber mit dem Schütteln aufhört, verschwindet der Schaum augenblicklich, ohne auch nur ein kleines Schaumbläschen zu hinterlassen. *Windisch* und *Beermann*[1]), die sich mit dem Schäumen des Bieres eingehend beschäftigten, haben deshalb unterschieden zwischen solchen Substanzen, die den Schaum bilden, also zwischen Schaumbildnern, und solchen, die den Schaum halten, den Schaumhaltern. Zu letzteren gehören in erster Reihe die Kolloide, und es wird in folgendem nur von den Schaumhaltern die Rede sein.

Mit der oben beschriebenen, höchst einfachen Methodik untersuchten wir zunächst den Harn von normalen Individuen auf seine Schaumkraft. Bei den starken Schwankungen im spezifischen Gewicht war es notwendig, um die Werte von verschiedenen Urinen untereinander vergleichen zu können, durch Zusatz von Wasser alle zunächst auf ein und dasselbe spezifische Gewicht von 1010 zu bringen. Sodann verteilten wir die einzelnen Verdünnungen auf eine Reihe gleich hoher und gleich weiter Reagenzgläschen, schüttelten ein jedes, wie oben beschrieben, kräftig durch und beobachteten, in welcher Verdünnung noch der Schaum nach dem Schütteln bestehen blieb. Als positiv betrachteten wir noch dasjenige Gläschen, in dem sich über der Flüssigkeit ein feiner Saum von kleinen Schaumbläschen abgesetzt hatte. Auf diese Weise stellten wir fest, daß in einer Reihe von Fällen bei achtfacher Verdünnung, in einer anderen Reihe sogar noch bei 16facher Verdünnung die unterste Grenze der Schaumbildung lag.

Tabelle I.

Verdünnungsgrad	Urin					
	1	2	3	4	5	6
0	+	+	+	+	+	+
2 fach	+	+	+	+	+	+
4 „	+	+	+	+	+	+
8 „	+	+	+	+	+	+
16 „	—	—	—	+	+	+
32 „	—	—	—	—	—	—

[1]) *W. Windisch* und *V. Beermann*, Wochenschr. f. Brauerei, Jahrg. 37, S. 109ff., 1920.

Alsdann untersuchten wir, ob die Nahrungsaufnahme von Einfluß auf die Schaumbildung ist, und stellten fest, daß im nüchternen Zustande der Urin bei einer stärkeren Verdünnung schäumt als nach Nahrungsaufnahme, d. h. daß im nüchtern gelassenen Urin mehr Kolloide enthalten sind als in dem nach einer Mahlzeit produzierten.

Diese Untersuchungen betrachteten wir aber mehr als Vorversuche. Uns interessierte in erster Reihe, mit Hilfe der Schüttelmethode etwas über die Natur der im Harne gelösten Kolloide zu erfahren. Darüber ist bisher noch nichts bekannt. Man kann nun die Kolloide je nach ihrer elektrischen Ladung in drei Gruppen teilen, in positiv, negativ und amphoter geladene Kolloide. Wir bemühten uns nun festzustellen, welche dieser drei Gruppen im Harne vertreten ist.

Um dies zu entscheiden, verwandten wir Sorbentien von ganz bestimmter elektrischer Ladung, von der Überlegung ausgehend, daß sie vermöge ihrer Eigenschaft, Kolloide entgegengesetzter Ladung zu adsorbieren, auch die Fähigkeit besitzen, aus dem Harne die entsprechenden Kolloide zu entfernen. Als Typen solcher Sorbentien sind das negativ geladene Kaolin und das positiv geladene Aluminiumoxyd, Aluminium oxydatum pro analysi (*Merck*), bekannt.

Wir wollten zunächst feststellen, ob im Harne positiv geladene Kolloide enthalten sind. Zu dem Zwecke wurden 20,0 ccm frischen Urins mit 2 g Kaolin versetzt und auf einer Schüttelmaschine 30 Minuten lang geschüttelt. Danach wurde filtriert und das Filtrat auf Schaumbildung in der üblichen Weise untersucht und mit nativem Harne verglichen. Dabei zeigte sich, daß nach der Behandlung mit Kaolin der Harn fast vollkommen seine Fähigkeit, beim Schütteln zu schäumen, eingebüßt hatte. Wenn man ihn verdünnt oder auch unverdünnt schüttelte, so konnte man wohl eine Schaumbildung beobachten, aber die Schaumbläschen verschwanden sofort wieder. Hiernach dürfte der Schluß berechtigt sein, daß die im Urin vorhandenen schaumbildenden Kolloide vorwiegend positive Ladung aufweisen. Wenn das richtig war, so mußte eine Behandlung desselben Urins mit dem positiv geladenen Aluminiumoxyd ohne wesentliche Wirkung auf die Schaumbildung bleiben. Das war in der Tat der Fall.

Der Versuch mit Aluminiumoxyd wurde in analoger Weise wie mit Kaolin ausgeführt. 20,0 ccm frisch gelassenen Urins wurden mit 0,5 g Fasertonerde (*Merck*) 30 Minuten auf der Schüttelmaschine geschüttelt, danach filtriert und nun die Prüfung auf Schaumbildung mit dem Filtrat in unverdünntem und verdünntem Zustande vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß die Vorbehandlung mit Aluminiumoxyd fast ohne jeden Einfluß auf die Schaumbildung des Urins geblieben war. Als Beleg führen wir aus der großen Zahl unserer Versuche nur zwei mit zwei verschiedenen Urinen an.

Tabelle II.

Verdünnungsgrad	Urin 1			Urin 2		
	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin
0	+	+	—	+	+	—
2 fach	+	+	—	+	+	—
4 „	+	+	—	+	+	—
8 „	+	+	—	+	±	—
16 „	+	±	—	—	—	—
32 „	—	—	—	—	—	—

Das Resultat war in allen Fällen das gleiche. Es änderte sich auch nicht, wenn der Urin mit noch so großen Mengen Aluminiumoxyd vorbehandelt wurde. Bei dem sehr geringen spezifischen Gewicht des Aluminiumoxyds gegenüber dem Kaolin hatten wir in unseren ersten Versuchen gleiche Volummengen der Adsorbentien verwandt. Später aber haben wir unsere Versuche mit gleichen Gewichtsmengen ausgeführt und bisweilen sogar die doppelte, ja dreifache Menge des Aluminiumoxyds zur Ausschüttelung benutzt. Trotzdem diese dem Volumen nach etwa fünf- bzw. achtmal so viel beträgt wie die des Kaolins, sahen wir niemals eine wesentliche Abschwächung in der Schaumbildung des Urins.

Hiernach untersuchten wir, inwieweit die im Urin enthaltenen kristalloiden Substanzen an der Schaumbildung beteiligt sind. Wenn sie dabei eine Rolle spielten, so mußte nach ihrer Entfernung sich eine Änderung in der Schaumbildung gegenüber dem nativen Urin zeigen. Um sie aus dem Urin zu eliminieren, dialysierten wir den Urin in kleinen Pergamentschläuchen 24, bisweilen auch 48 Stunden lang gegen fließendes Wasser unter Verwendung von Toluol als Desinfizienz, um einer Zersetzung vorzubeugen. Hiernach wurde der salzfreie Urin in der üblichen Weise auf Schaumbildung untersucht und mit dem salzhaltigen verglichen. Dabei zeigte sich in keinem Falle ein Unterschied zwischen dem dialysierten und dem nativen Urin. Hieraus folgt, daß die Nichtkolloide des Urins mit der Schaumbildung nichts zu tun haben.

Nun konnte man aber daran denken, daß die Gegenwart von Salzen im Urin bei der Behandlung mit Kaolin bzw. Aluminiumoxyd eine Rolle spielen könnten. Denn die Wirkung der Sorbentien wird doch in mehr oder weniger hohem Grade auch beeinflußt durch die Reaktion des Mediums, in dem sie wirken sollen. Man begegnet nun bekanntlich neben neutralen sehr oft — je nach der Art der Nahrung — auch sauer oder alkalisch reagierenden Urinen, und man konnte vermuten, daß in Gegenwart von sauren Phosphaten die Wirkung der Sorbentien eine andere ist als in Gegenwart von schwachen Alkalien. Deshalb wiederholten wir noch einmal die Ausschüttelungsversuche

mit Kaolin und Aluminiumoxyd an durch Dialyse salzfrei gemachten Urinen und kamen dabei zu folgendem Ergebnis: Wurde der Urin 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert und dann einerseits mit Kaolin, andererseits mit Fasertonerde behandelt, so zeigte sich kein Unterschied gegenüber dem Verhalten des nicht dialysierten Urins, d. h. Kaolinbehandlung entzog dem dialysierten Urin die schaumbildenden Kolloide, Fasertonerde blieb ohne nennenswerten Einfluß. Vielleicht, daß in der schwächsten noch schäumenden Verdünnung die Schaumbläschen schneller verschwanden als in dem entsprechenden Gläschen des Kontrollversuches. Sehr deutlich war dieser Unterschied jedenfalls nicht. — Wenn wir aber die Dialyse des Urins über 48 Stunden ausdehnten, zeigte sich, daß auch die Ausschüttelung mit Aluminiumoxyd von deutlichem Einfluß auf die Schaumbildung des Urins war. Als Beleg dafür führen wir je einen Versuch mit 24stündiger und 48stündiger Dialyse an.

Tabelle III.

Verdünnungsgrad	Nativer Urin			24 Std. dialysiert			48 Std. dialysiert		
	—	Alum.-oxyd	Kaolin	—	Alum.-oxyd	Kaolin	—	Alum.-oxyd	Kaolin
0	+	+	±	+	+	±	+	±	±
2 fach . . .	+	+	—	+	+	—	+	±	—
4 „ . . .	+	+	—	+	+	—	+	±	—
8 „ . . .	+	+	—	+	+	—	+	±	—
16 „ . . .	+	+	—	+	±	—	+	—	—
32 „ . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Aus der Tabelle III geht deutlich hervor, daß, wenn man die Dialyse lange genug fortsetzt, es auch durch Ausschütteln mit Aluminiumoxyd gelingt, die Schaumbildner aus dem Urin fast vollkommen zu entfernen. Man kann zwar noch leichte Schaumbildung in achtfacher Verdünnung beobachten, aber hier sowohl wie in den höher konzentrierten Portionen verschwand der Schaum stets sehr schnell und hinterließ selbst in der unverdünnten Portion keine bleibenden Schaumbläschen mehr.

Wir ersehen daraus, daß in der Tat die Kationen es sind, welche den Kolloiden des Urins eine ausgesprochene positive Ladung erteilen. Werden sie durch Dialyse nur teilweise entfernt, so verlieren die Kolloide etwas von ihrer elektrischen Ladung, und es ändert sich fürs erste noch nichts an der Wirkung des Aluminiumoxyds. Erst wenn die Dialyse so weit fortgesetzt wird, daß alle Kationen vollständig oder nahezu vollständig eliminiert werden, verringert sich der Grad ihrer elektrischen Ladung so weit, daß die Kolloide sich dem amphoteren Punkte sehr stark nähern oder geradezu amphoter werden. In diesem Zustande können sie dann von der Fasertonerde ebenso adsorbiert

werden wie vom Kaolin. Diese Erklärung setzt allerdings voraus, daß bei allen diesen Vorgängen einzig und allein die elektrische Ladung der Kolloide das ausschlaggebende Moment ist. Ob diese Voraussetzung aber zutrifft und nicht doch noch andere Kräfte dabei eine Rolle spielen, möchten wir dahingestellt sein lassen.

Nachdem wir uns so über die Wirkung der Kationen auf die Kolloide des Urins orientiert hatten, schien es wünschenswert, auch den direkten Einfluß eines Anions kennenzulernen. A priori mußte man erwarten, daß in Gegenwart eines solchen die natürliche positive Ladung der Kolloide teilweise oder ganz verschwinden und in eine nahezu amphotere übergehen müßte. Als Anion benutzten wir Essigsäure, prüften zunächst den nativen Urin in der üblichen Weise auf seine Schaumkraft und sein Verhalten gegenüber Kaolin und Fasertonerde, säuerten ihn dann mit Essigsäure an und untersuchten ihn dann in der gleichen Weise. Dabei zeigte sich, wie wir erwartet hatten, daß durch die Gegenwart von Essigsäure die Kolloide die Fähigkeit angenommen hatten, auch von der positiv geladenen Fasertonerde adsorbiert zu werden. Ein Parallelversuch mit dem gleichen Urin, der vorher durch verdünnte Sodalösung alkalisch gemacht war, ergab das gleiche Resultat wie der native Urin, wie aus der Tabelle IV ersichtlich.

Tabelle IV.

Verdünnungsgrad	Normaler Urin			Mit Essigsäure anges.			Mit Na_2CO_3 alkalisiert		
	nativ	Alum.-oxyd	Kaolin	nativ	Alum.-oxyd	Kaolin	nativ	Alum.-oxyd	Kaolin
0	+	+	±	+	±	±	+	+	±
2 fach . . .	+	+	—	+	±	—	+	+	—
4 „ . . .	+	+	—	+	—	—	+	+	—
8 „ . . .	+	+	—	+	—	—	+	+	—
16 „ . . .	+	+	—	+	—	—	+	+	—
32 „ . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Sodann versuchten wir auch, mit Hilfe der Kataphorese einen Einblick in die Beschaffenheit der Kolloide zu gewinnen. Wir hofften, auf diese Weise durch Wanderung im elektrischen Felde eine Trennung der positiv geladenen Kolloide von den eventuell vorhandenen negativ geladenen durchführen zu können. Herr Prof. Dr. *Freundlich* in Dahlem hatte die große Liebenswürdigkeit, uns seine Apparatur für diese Versuche zur Verfügung zu stellen und uns mit Rat und Hilfe dabei zu unterstützen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank zum Ausdruck bringen möchten.

Wir führten zunächst einen Versuch mit nativem Urin aus, indem wir beide Schenkel des Apparates mit destilliertem Wasser beschickten, nachdem wir zuvor in das U-Rohr den nativen Urin gebracht hatten.

Es wurde während 24 Stunden ein Strom von starker Spannung (120 Volt) durch das System geschickt und dann die in beiden Schenkeln befindlichen Flüssigkeiten gesondert auf ihre Schaumkraft geprüft. Dabei ließ sich jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen der Anoden- und Kathodenportion erkennen.

Derselbe Versuch wurde noch einmal mit dialysiertem Urin ausgeführt. Um jede störende Salzwirkung auszuschließen, dialysierten wir den Urin 3 Tage lang gegen fließendes Wasser und überschichteten ihn zum Schutz gegen bakterielle Zersetzung mit Toluol. Nach beendigter Dialyse zeigte der Urin das abnorm niedrige spezifische Gewicht von 1003. Um das beim Schüttelversuch störende Toluol zu beseitigen, wurde der Urin durch ein feuchtes Filter filtriert und nun in die beiden Schenkel des Apparates eingefüllt. Bei dem sehr niedrigen spezifischen Gewicht des Urins waren wir dieses Mal gezwungen, die Überschichtung statt mit destilliertem Wasser mit 10proz. Alkohol vorzunehmen. Daraufhin wurde während 48 Stunden ein Strom von derselben Spannung wie im ersten Versuche durchgeschickt und nach Beendigung des Versuches der Inhalt der beiden Schenkel auf seine Schaumfähigkeit geprüft. Dabei zeigte sich, daß der Inhalt des Anodenschenkels nicht unbeträchtliche Schaumkraft besaß, während der des Kathodenschenkels nur ganz wenig Schaumbildung aufzuweisen hatte, wie aus der Tabelle V ersichtlich ist.

Tabelle V.

Verdünnungsgrad	Kontrollportion	Anodenschenkel	Kathodenschenkel
0	+	+	+
2 fach	+	+	—
4 „	+	+	—
8 „	+	—	—
16 „	+	—	—
32 „	—	—	—

Man könnte hieraus folgern, daß, da durch die gründliche Dialyse so gut wie sämtliche Kationen aus dem Urin beseitigt waren, die vorher stark positiv geladenen Kolloide einen ausgesprochen amphoteren Charakter oder gar zum Teil eine geringe negative Ladung angenommen, und daß aus diesem Grunde eine Wanderung der Kolloide vorwiegend zum positiven Pol stattgefunden hatte. Dieses Resultat steht in guter Übereinstimmung mit dem Verhalten der Kolloide gegenüber dem Aluminiumoxyd nach gründlicher Dialyse des Urins, indem sie von ihm fast vollkommen adsorbiert werden, während vor der Dialyse die positive Fasertonerde ohne jeden Einfluß auf sie ist.

Weiter prüften wir, wie die Schaumsubstanzen sich verschiedenen Temperaturen gegenüber verhalten. Zu dem Zwecke wurde normaler

Urin 10 Minuten lang auf freiem Feuer gekocht und dann auf seine Schaumbildung untersucht. Dabei zeigte sich keine Änderung gegen früher. Auch bei der Behandlung des vorher gekochten Urins mit Kaolin und Fasertonerde war kein Unterschied gegenüber dem nichtgekochten Urin zu konstatieren. Ebenso trat bei noch langsamerem Erhitzen des Urins bis 30 Minuten und darüber hinaus keine Änderung in dem Verhalten der Schaumbildner ein. Auch tiefe Temperaturen (bis -12^0 C) blieben ohne Einfluß auf die Kolloide des Urins.

Sodann untersuchten wir, wie die Schaumbildner sich einzelnen Solventien gegenüber verhalten, und zwar verwandten wir für diese Versuche Alkohol, Aceton und Äther. Wir gingen dabei so vor, daß wir 50 ccm Urin in einer Porzellanschale auf einem siedenden Wasserbade zur Trockne einengten, den trockenen Rückstand mit 50,0 ccm absolutem Alkohol extrahierten, vom Ungelösten abfiltrierten und aus dem Filtrat den Alkohol wieder verjagten. Der Rückstand wurde in 50 ccm destillierten Wassers aufgenommen und auf seine Schaumkraft untersucht. Dabei zeigte sich, daß ein geringer Teil der Kolloide in den Alkohol übergegangen war. — Die Versuche mit Aceton und Äther, die in analoger Weise durchgeführt wurden, hatten ein gänzlich negatives Ergebnis.

Endlich war es auch von Interesse, ein Urteil über die Größe der schaumbildenden Kolloide zu bekommen. Darüber konnten am besten Filtrationsversuche Auskunft geben mit den *de Haen*schen Membranfiltern von verschiedener Porengröße. Wir verwandten solche von der Größe Nr. 5, 30, 60, 100 und 300. Herrn Prof. Dr. *Traube* sind wir zu ganz besonderem Dank verpflichtet für die freundliche Bereitwilligkeit, mit der er uns den Filtrationsapparat in seinem Laboratorium zur Verfügung stellte. Die Versuche ergaben, daß schon das Filter Nr. 5 sämtliche Schaumsubstanzen zurückhält. Denn wenn man das Filtrat nachher auf seine Schaumfähigkeit untersuchte, ergab sich bei allen von uns geprüften Urinen, daß sie ihr Schaumvermögen völlig eingebüßt hatten. Demnach müssen die schaumbildenden Kolloide des Harns entsprechend der Porengröße des 05-Membranfilters mindestens die Größe von 1 μ besitzen.

Wir haben oben gesehen, daß für das Zustandekommen des Schaumes einer Flüssigkeit Substanzen erforderlich sind, die die Tendenz haben, sich an der Oberfläche dieser Flüssigkeit anzusammeln. Es lag darum der Gedanke nahe, daß die Schaumbildner des Urins in irgend einer Beziehung zu seinen oberflächenaktiven Stoffen stehen, deren Menge eine recht beträchtliche sein kann, wie wir aus den eingehenden Untersuchungen von *Schemensky*[1]), *Bechhold*[2]) u. a. wissen.

[1]) *Schemensky*, diese Zeitschr. 105, 229, 1920.
[2]) *Bechhold*, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 31.

Diese Frage war am einfachsten mit Hilfe des Kaolins zu lösen. Wir wissen, daß durch Schütteln mit Kaolin dem Urin fast alle schaumbildenden Substanzen entzogen werden. Wenn also die Schaumbildung mit den Stalagmonen, wie *Bechhold* die oberflächenaktiven Stoffe des Urins nennt, etwas zu tun hatte, so mußten diese durch das Kaolin ebenso entfernt werden wie die Schaumbildner, und es mußte der Urin nach der Behandlung mit Kaolin eine andere Oberflächenspannung zeigen als vor derselben. Wir bestimmten deshalb zunächst im nativen Urin die Oberflächenaktivität nach *Traube* einmal durch Feststellung der Tropfenzahl und dann zur Kontrolle mit dem Viskostalagmometer durch Ermittlung der Tropfengröße. Dabei stellte sich heraus, daß nativer Urin, mit Kaolin geschüttelt, dieselbe Oberflächenaktivität zeigt wie vorher. Dasselbe Ergebnis hatten wir auch, wenn wir den Urin vorher durch Dialyse von seinen kristalloiden Substanzen befreit hatten und dann mit Kaolin ausschüttelten; es zeigten sich keine Veränderungen in der Oberflächenaktivität, obzwar der Urin seine Schaumfähigkeit gänzlich verloren hatte.

Wenngleich schon aus diesen Versuchen mit Sicherheit hervorging, daß Schaumbildung und Stalagmone nichts miteinander zu tun hatten, so war es doch nicht uninteressant, auch das Verhalten des mit Fasertonerde vorbehandelten Urins in der gleichen Weise zu untersuchen. Denn es war immerhin möglich, daß die Stalagmone ganz oder zum Teil durch Aluminiumoxyd adsorbiert werden, während die Schaumsubstanzen bekanntlich fast ganz unbeeinflußt bleiben. Es ergab sich jedoch, daß auch nach Vorbehandlung des nativen sowohl wie dialysierten Urins mit Fasertonerde die Oberflächenaktivität sich nicht geändert hatte. Als Beleg führen wir je einen Versuch mit Kaolin und Fasertonerde an.

Tabelle VI.

	Normaler Urin			Dialysierter Urin		
	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin
Tropfenzahl .	97	96	96	92	93	93
Tropfengröße .	115	117	115	117	114	115

Auf einen Versuch mit Tierkohle, zu der die Stalagmone des Urins eine besondere Affinität haben, mußten wir verzichten, da uns Vorversuche gezeigt hatten, daß, wenn man Tierkohle mit Wasser schüttelt, schaumbildende Substanzen aus der Kohle in das Wasser übergehen.

Nachdem wir uns so über das physikalische Verhalten der schaumbildenden Kolloide des Urins orientiert hatten, war es auch von Interesse, etwas über ihre chemische Beschaffenheit in Erfahrung zu bringen. Zu diesem Zwecke war es erforderlich, sie aus dem Gemenge der Salze

und der anderen im Harne gelösten Kristalloide zu isolieren. Eine Möglichkeit hierzu war gegeben durch die große Affinität der Schaumbildner zum Kaolin. Denn wir haben oben gesehen, daß es mit Leichtigkeit gelingt, sie durch Schütteln mit Kaolin dem Urin vollkommen zu entziehen. Nun mußte man bedenken, daß die Gesamtmenge der Schaumbildner nur eine sehr kleine sein konnte, und daß, wenn man sie chemisch analysieren wollte, man ein möglichst großes Quantum zur Verfügung haben mußte. Dementsprechend gingen wir so vor, daß wir 200,0 ccm Urin mit 10 g Kaolin, das wir vorher durch starkes Glühen von allen organischen Bestandteilen befreit hatten, einige Stunden auf der Schüttelmaschine schüttelten, danach abfiltrierten und mehrmals mit destilliertem Wasser nachwuschen, bis im Waschwasser kein Cl mehr nachweisbar war. Um nun die auf das Kaolin niedergeschlagenen Kolloide von dem Sorbens zu trennen, wurde der Filterrückstand in 100 ccm 1 proz. Natriumcarbonatlösung aufgeschwemmt, mehrere Stunden unter häufigem Schütteln im Wasserbade von 38^0 C gehalten und dann bis zum nächsten Tage im Eisschrank aufbewahrt. Alsdann wurde der alkalische Extrakt von dem Kaolin durch scharfes Zentrifugieren getrennt, mit verdünnter Salzsäure genau neutralisiert und nun auf seine Schaumbildung untersucht. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle die Schaumfähigkeit einer anderen Sodalösung von gleicher Konzentration, die in der gleichen Weise mit verdünnter Salzsäure genau neutralisiert war, geprüft. Dabei zeigte sich, daß der Extrakt so stark schaumbildend war, daß noch bei 16facher Verdünnung Schaumbläschen zu konstatieren waren. Während die Kontrolle überhaupt keine Spur einer Schaumbildung zeigte. Wir durften daraus schließen, daß in die Sodalösung ein großer Teil der schaumbildenden Kolloide von dem Kaolin übergegangen war. In einem aliquoten Teile dieses Sodaextraktes bestimmten wir nun nach *Kjeldahl* den Stickstoffgehalt und ermittelten für den gesamten Extrakt in einem Falle 9,87 mg N, in einem anderen Versuche, den wir in der gleichen Weise durchgeführt hatten, 13,692 mg N. Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß die schaumbildenden Kolloide stickstoffhaltige Substanzen sind. Diese Schlußfolgerung wäre aber nur dann zwingend, wenn wir die Gewißheit hätten, daß der sodaalkalische Extrakt von organischen Substanzen tatsächlich nur die Kolloide und nichts anderes enthielt. Diese Gewißheit fehlt uns aber; denn wir wissen nicht, ob nicht das Kaolin neben den Kolloiden noch andere Substanzen des Harns adsorbiert hat, die an sich gar nichts mit der Schaumbildung zu tun haben und gleichsam nur als Begleitstoffe über das Kaolin in den alkalischen Extrakt gewandert sind. Solange dieser Punkt nicht geklärt ist, möchten wir die Annahme, daß die Kolloide stickstoffhaltige Produkte sind, noch für unentschieden halten.

Im Anschluß an diese Untersuchungen, die der Erforschung des Charakters der schaumbildenden Kolloide des Urins galten, beschäftigten wir uns auch mit dem Verhalten der Kolloide in pathologischen Harnen. Als solche wählten wir zunächst Urine von Nephritikern. A priori war ja zu erwarten, daß die Gegenwart von Eiweiß im Urin die Schaumkraft ganz erheblich verstärken muß, und daß sie um so größer sein würde, je mehr Eiweiß sich im Urin findet. Dementsprechend schäumte ein Eiweißurin mit einem Albumingehalt von 1,3 Proz. (nach *Aufrecht*) noch bei einer 256fachen Verdünnung, während ein normaler Urin, wie wir oben gesehen haben, im Höchstfalle nur noch bei 16facher Verdünnung Schaumbildung zeigte. Wir sehen also, daß durch die Gegenwart von Eiweiß die Schaumkraft des Urins um das 16fache des normalen Wertes gestiegen war.

Ein solcher Eiweißurin verhält sich auch den Sorbentien gegenüber anders als ein normaler. Schüttelt man ihn mit der gleichen Kaolinmenge wie einen normalen Urin, so ändert sich natürlich zunächst nichts in der Schaumbildung; wenn man ihn dann aber mit einer größeren Kaolinmenge noch einmal behandelt, so verliert er wie ein normaler Urin seine Schaumkraft. Ein ähnliches Verhalten zeigt er der Fasertonerde gegenüber. Geringe Mengen sind ohne Einfluß; bei Verwendung größerer Mengen aber nimmt die Schaumkraft beträchtlich ab. Dieser Befund konnte zunächst so ausgelegt werden, daß bei Nephritis neben dem Eiweiß noch negativ geladene Kolloide ausgeschieden werden, wie sie sich im normalen Urin nicht finden; denn der normale Urin wird durch die Behandlung mit Fasertonerde so gut wie gar nicht beeinflußt. Dieser Erklärung widerspricht aber der Kaolinversuch. Denn mit Kaolin gelingt es, den Urin so zu behandeln, daß er seine Schaumfähigkeit vollkommen eingebüßt hat. Wenn aber neben den vom Kaolin adsorbierten positiven Kolloiden noch negative Kolloide vorhanden wären, so müßte ein solcher Urin, vorausgesetzt, daß diese negativ geladenen Kolloide Schaumbildner sind, auch bei ausgiebiger Ausschüttelung mit Kaolin wenigstens einen Teil seiner Schaumkraft beibehalten. Das ist aber, wie wir oben schon betont haben, nicht der Fall. Somit können wir aus dem Versuche mit Fasertonerde nur schließen, daß auch von ihm bei ausgiebiger Verwendung ein Teil des Eiweißes adsorbiert wird.

Wenn man dann weiter einen Nephritisurin durch Erhitzen mit Essigsäure von seinem Eiweiß befreit und ihn dann auf Schaumbildung und sein Verhalten gegenüber Kaolin und Fasertonerde untersucht, so unterscheidet er sich in nichts vom normalen Urin. Allerdings zeigt er eine weit größere Schaumkraft. Dieses Plus aber kann noch bedingt sein durch minimale Eiweißmengen, die der Koagulation durch Essigsäure entgangen waren. Mit Kaolin gelingt es aber sehr leicht, ihn der

schaumbildenden Kolloide zu berauben, und bei der Behandlung mit Fasertonerde nimmt die Schaumkraft gleichfalls ab wie bei normalem, mit Essigsäure angesäuertem Urin.

Neben Urin mit reichlichem Eiweißgehalt haben wir noch solche Urine untersucht, die bei der Reaktion mit Sulfosalicylsäure nur Spuren von Eiweiß zeigten. Diese Urine schäumten natürlich nicht so stark wie ein eiweißreicher Urin, aber immer noch kräftiger als ein normaler Urin; sonst aber verhielten sie sich bei der Behandlung mit Kaolin bzw. Fasertonerde wie ein normaler Urin.

Endlich haben wir auch Urine von ausgesprochener Glomerulus-erkrankung und auch solche von Nephritiden rein tubulärer Charaktere untersucht, haben dabei aber keine Unterschiede zwischen beiden gefunden.

Ferner haben wir auch Urin von anderen Krankheiten auf seine Schaumkraft untersucht, so Urine von Diabetikern und von Ikterischen, dabei fanden wir ganz regelmäßig, daß beim Ikterusharn die Schaumbildung eine weit stärkere war als im normalen, während beim Diabetiker die Schaumbildung weit schwächer war. Dies erklärt sich wohl aus der abnorm starken Verdünnung des diabetischen Urins, während der Ikterusharn offenbar wegen der beigemengten Galle mehr Kolloide als der normale enthält. In ihrem Verhalten Kaolin und Fasertonerde gegenüber zeigte sich keine Abweichung gegenüber dem normalen Urin.

II. Blut.

Schließlich haben wir auch die Bestandteile des Blutes auf ihre Schaumkraft untersucht, und zwar zunächst das Serum. Bei dem großen Eiweißgehalt des Serums war es natürlich nicht zweckmäßig, mit dem unverdünnten Serum zu arbeiten. Wir machten uns deshalb Verdünnungen in der Weise z. B., daß wir auf 10,0 ccm destillierten Wassers einen Tropfen Serum gaben und dann den Schüttelversuch ausführten. In dieser Weise verglichen wir eine Reihe verschiedener Sera und fanden etwa eine Schaumkraft, die der des normalen Urins ungefähr entsprach. Wenn wir die Verdünnung so wählten, daß wir statt eines Tropfens die fünffache Menge in 10 ccm Wasser gaben, so stieg die Schaumkraft nicht um das Fünffache, sondern um das 16- bis 32fache.

Wir untersuchten nun, wie solche Serumverdünnungen sich bei der Ausschüttelung mit Kaolin und mit Fasertonerde verhalten. Dabei zeigte sich, daß bei der Ausschüttelung beide die schaumbildende Substanz in gleicher Weise adsorbieren, bisweilen sogar die Adsorption durch Fasertonerde noch stärker ist als durch Kaolin. Wir sehen hier also einen prinzipiellen Unterschied zwischen den Kolloiden des Urins und denen des Serums: im Urin bleibt die Fasertonerde vollkommen

wirkungslos, im Serum wirkt sie nicht nur ebensogut, sondern mitunter sogar noch besser als das Kaolin.

Dieses Überwiegen der Fasertonerde über das Kaolin tritt besonders deutlich in die Erscheinung bei Serum von Nephritikern. Hier sehen wir nach Fasertonerde mitunter ein fast völliges Verschwinden der Schaumbildung, während nach Kaolin stets nur eine geringe Abschwächung zu erzielen ist. Es hat hiernach den Anschein, als wenn sich im Serum von Nephritikern Kolloide finden, die eine andere Ladung besitzen als die des normalen Serums.

Tabelle VII.

Verdünnungskoeffizient	Nephritikerserum (5 Tropfen in 10,0 H_2O)					
	1			2		
	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin	nativ	Aluminiumoxyd	Kaolin
0	+	+	+	+	+	+
2	+	—	+	+	+	+
4	+	—	+	+	+	+
8	+	—	+	+	+	+
16	+	—	+	+	—	+
32	+	—	+	+	—	+
64	+	—	—	+	—	+
128	+	—	—	+	—	—
256	—	—	—	+	—	—
512	—	—	—	—	—	—

Zum Schluß haben wir noch die korpuskularen Elemente des Blutes auf ihre Schaumkraft untersucht, indem wir frisches defibriniertes Blut scharf zentrifugierten und die abzentrifugierten Blutkörperchen durch mehrmaliges Waschen mit 0,85proz. Kochsalzlösung von dem anhaftenden Serum befreiten. Danach wurde 1,0 ccm Blutkörperchen in 50 ccm destillierten Wassers gelöst und mit dieser Lösung einige Versuche angestellt. Es zeigte sich, daß die Schaumkraft einer solchen Lösung nicht sehr beträchtlich ist: sie bleibt etwas hinter der Schaumkraft des Harns zurück. Ausschütteln mit Kaolin und Aluminiumoxyd bleibt ohne Einfluß auf die Schaumkraft. Wenn man diese Blutlösung mit ein paar Tropfen Essigsäure ansäuert, so nimmt die Schaumkraft ganz ungeheuer zu: sie steigt bisweilen um das 32- bis 64fache der ursprünglichen Stärke und wird in diesem sauren Zustande auch von Kaolin und Fasertonerde in mäßigem Grade beeinflußt. Hierbei zeigte sich aber kein Unterschied zwischen den beiden Sorbentien. Wenn man andererseits die frische Blutlösung mit ein paar Tropfen Sodalösung schwach alkalisch macht, so wird auch dadurch die Schaumkraft etwas erhöht, aber Kaolin und Fasertonerde sind bei dieser Reaktion ohne jeden Einfluß.

Zusammenfassung.

1. Im Urin finden sich schaumbildende Kolloide in großer Zahl; ihre Menge schwankt in mäßigen Grenzen. Im nüchternen Zustande sind mehr Kolloide enthalten als nach Nahrungsaufnahme.

2. Die Schaumkolloide des Harns zeigen eine ausgesprochen positive Ladung; denn es gelingt durch Schütteln mit Kaolin, sie aus dem Urin vollkommen zu isolieren, während Behandlung mit Aluminiumoxyd ohne Einfluß ist.

3. Diese ausgesprochen positive Ladung wird in erster Reihe bedingt durch die Gegenwart der Kationen im Urin. Denn wenn man diese durch Dialyse entfernt, verlieren die Kolloide fast vollkommen ihre positive Ladung und nehmen nahezu amphoteren Charakter an. Das konnte durch ihr Verhalten sowohl gegenüber Sorbentien wie im elektrischen Felde festgestellt werden.

4. Durch hohe oder tiefe Temperaturen wird der Charakter dieser Kolloide nicht verändert.

5. Irgendwelche Beziehungen zwischen ihnen und den Stalagmonen des Harns bestehen nicht.

6. Vermutlich sind die Schaumkolloide stickstoffhaltiger Natur und haben eine Größe von mindestens 1 μ.

7. Nephritisurin enthält entsprechend der in ihm vorhandenen Eiweißmenge weit mehr Schaumkolloide als der normale Urin. Auch der Ikterusharn ist reicher an Kolloiden.

8. Ganz besonders groß ist ihre Aktivität im Serum. Die Serumkolloide zeigen im Gegensatz zu denen des Urins eine vorwiegend negative Ladung; besonders reich an solchen Kolloiden ist das Serum von Nephritikern.

9. Wässerige Aufschwemmungen von Blutkörperchen besitzen nur geringe Schaumkraft; nach Ansäuern mit Essigsäure wird dieselbe aber gewaltig gesteigert. Kaolin und Fasertonerde beeinflussen sie nur in geringem Maße.

Zur Kenntnis der Diastasen.

Zugleich ein Beitrag zur Frage der Zweienzymtheorie.

Von

K. Hizume (Osaka, Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 13. Januar 1924.)

Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen scheint auf den ersten Blick hervorzugehen, daß die Diastase kein einheitliches Enzym ist, sondern aus mindestens zwei Fermentgruppen zusammengesetzt ist, von denen die eine die Stärke verflüssigt, die andere die gebildeten Dextrine verzuckert.

Diese zuerst von *Cusenier* geäußerte Ansicht hat vielfach ihre Verfechter gefunden und ist durch verschiedene Beobachtungen zu stützen versucht worden. So haben *Grützner*[1]) und *Bourquelot*[2]) an der Speichelamylase gezeigt, daß man durch kurzes Erhitzen auf 80° die saccharifizierende Wirkung zerstören kann, während die stärkelösende noch zum Teil erhalten bleibt. Denselben Befund haben auch *Pottevin*[3]) und später *Fernbach* und *Schoen*[4]) an der Malzdiastase erhoben. Bei all diesen Beobachtungen muß man aber berücksichtigen, daß die verflüssigende Kraft der Amylase noch in ganz geringen Quantitäten eine deutliche Wirkung zustande bringen kann, während die verzuckernde von der gleichen Größenordnung schon nicht mehr in die Erscheinung zu treten braucht. Ihre Wirkung ist eben eine viel gröbere und verlangt eine verhältnismäßig viel größere Fermentmenge, auch wenn sie nur Spuren von Zucker abspalten soll. Wahrscheinlich liegen hier die Verhältnisse ähnlich wie beim Lab und Pepsin. Bekanntlich kann das Lab schon in so geringen Quantitäten Milch zur Gerinnung bringen, in denen Pepsin noch keine Spur einer Wirkung zu äußern vermag. Wenn man also eine Pepsinlösung erhitzt und feststellt, daß diese Lösung eine Fibrinflocke nicht mehr zu lösen vermag, wohl aber noch in geringem Maße befähigt ist, Milch zu koagulieren, so darf man hieraus, wie *Pawlow* betont, nicht den Schluß ziehen, daß man das Lab vom Pepsin befreit hat, Pepsin und Lab also zwei verschiedene Fermente sind. Der Beweis einer Trennung beider Fermente wäre erst dann erbracht, wenn es gelänge, eine so kräftig wirkende Lablösung herzustellen, wie wir sie sonst nur immer

---

[1]) *Grützner*, Pflügers Arch. **12**, 285, 1876.
[2]) *Bourquelot*, C. r. **104**, 576, 1881.
[3]) *Pottevin*, Ann. Inst. Pasteur **13**, 655, 1899.
[4]) *Fernbach* und *Schoen*, C. r. **151**, 894, 1910.

mit Pepsin gepaart anzutreffen pflegen. Das ist *Hammarsten* später auch gelungen. Dieselbe Forderung müssen wir auch an eine stärkeverflüssigende Fermentlösung stellen, wenn die beiden Fermente voneinander verschieden sein sollen. Bisher resultierte aber in sämtlichen Erhitzungsversuchen nur eine schwach wirksame Lösung.

Mehr Beweiskraft für die Zweienzymtheorie scheint den Dialysierversuchen von *Fraenkel* und *Hamburg*[1]) innezuwohnen. Sie konnten an Malzdiastase zeigen, daß es bei nahezu reinen Fermentlösungen gelingt, durch Dialyse den verzuckernden Anteil von dem stärkeverflüssigenden teilweise zu trennen. Wenn sie ihre gereinigte Diastaselösung gegen gekochtes Brunnenwasser dialysierten, so zeigte sich, „daß in das Wasser vornehmlich die verzuckernden Diastasen hineingehen, die verflüssigende dagegen innerhalb der Dialysiermembran bleibt". „Während die verzuckernde Kraft des Membraninhaltes eine in die Augen springende Abnahme erfuhr, zeigte sich die verflüssigende Kraft desselben völlig unverändert." *Fraenkel* und *Hamburg* haben also mit ihrem Dialysierverfahren keine vollkommene Trennung beider Fermentgruppen erreichen können, sondern nur eine partielle. Dazu kommt, daß sich in ihrer Arbeit leider keine näheren Angaben darüber finden, wie die Werte für die einzelnen Wirkungen ermittelt wurden, bei welcher Reaktion und bei welcher Temperatur, so daß die Beurteilung recht schwierig wird. Auch die von *Reinitzer*[2]) mit der Diastase des Akaziengummis ausgeführten Untersuchungen gestatten nicht ohne weiteres einen definitiven Schluß auf die Zweienzymtheorie. *Reinitzer* filtrierte eine 8proz. wässerige Lösung des Akaziengummis durch ein Pukallfilter und konnte im Filtrat eine schwache stärkeverflüssigende Eigenschaft feststellen, während der Filterrückstand kräftig stärkelösend und verzuckernd wirkte.

Den Schluß zu ziehen, wie *Reinitzer* das tut, daß eine Abtrennung des stärkelösenden Enzyms von der Amylasengruppe gelungen ist, erscheint uns zum mindesten gewagt. Denn erstens ist die Hauptmenge des stärkeverflüssigenden Enzyms im Filterrückstande geblieben und der durch das Filter gegangene Anteil so gering, daß er, wie aus den mitgeteilten Daten hervorgeht, erst nach 7½tägiger Einwirkung den Kleister verflüssigte. Sodann könnte man auch hier im Hinblick auf das, was wir oben über das Verhältnis von stärkeverflüssigender zu zuckerbildender Kraft der Diastase gezeigt haben, den Ausfall des Versuches mit der filtrierten Portion so erklären, daß neben dem stärkeverflüssigenden Anteil auch eine ganz geringe Menge des verzuckernden mit durch das Filter gegangen sein kann, daß diese aber so klein ist, daß sie ihre Anwesenheit durch die Bildung von Zucker nicht dokumentieren konnte, zumal ja auch der verflüssigende Anteil eine nur äußerst schwache Wirkung besaß.

Wir möchten also ebensowenig den Filtrationsversuch von *Reinitzer* wie den Dialysierversuch von *Fraenkel* und *Hamburg* als einwandsfreien Beweis für die Zweienzymtheorie ansehen. Ein solcher wäre unseres

---

[1]) *Fraenkel* und *Hamburg*, Hofmeisters Beitr. 8, 389, 1906.
[2]) *Reinitzer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 352, 1909.

Erachtens dann erbracht, wenn es gelänge, aus einer Diastaselösung einen Teil des zuckerbildenden Anteils so von dem stärkeverflüssigenden zu trennen, daß er nicht mehr die Fähigkeit besitzt, Stärkekleister zu verflüssigen, wohl dagegen aus verflüssigtem Kleister Zucker zu bilden. Der anderen Trennung, also den verflüssigenden Anteil von dem verzuckernden, würde nach dem oben Gesagten nur dann absolute Beweiskraft zukommen, wenn eine solche Fermentlösung sehr erhebliche verflüssigende Kraft besäße, eine verzuckernde aber selbst mit den empfindlichsten Methoden bei noch so langer Einwirkungsdauer sich nicht feststellen ließe. Bei dieser noch immer unklaren Sachlage schien es zweckmäßig, die Frage der Zweienzymtheorie in anderer Richtung in Angriff zu nehmen und eventuell einer Lösung näher zu führen.

Wir wissen, daß der verzuckernde Anteil der Diastase sich Neutralsalzen gegenüber in ganz bestimmter Weise verhält. So hat man festgestellt, daß unter ihnen die Chloride eine besonders bevorzugte Stellung einnehmen, indem sie die Diastase stark aktivieren, und zwar sind es, wie *Wohlgemuth*[1]) gezeigt hat, die Chlorionen, welche die Aktivierung bedingen. Ein ähnliches, doch nicht so starkes Aktivierungsvermögen besitzen die Bromsalze, während die anderen Halogene ohne nennenswerten Einfluß sind oder sogar die Diastase hemmen. Ferner hat *Wohlgemuth*[2]) und später *Koga*[3]) zeigen können, daß das Serum ganz besonders dazu befähigt ist, die Diastase zu aktivieren und daß dieses Aktivierungsvermögen zum Teil auf der Gegenwart von Salzen beruht, zum Teil aber auch an seine Kolloide gebunden ist. Das alles gilt aber nur für die tierische Diastase. Die pflanzliche Diastase verhält sich allen diesen Substanzen gegenüber völlig refraktär.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Wohlgemuth* habe ich nun geprüft, wie die verflüssigende Kraft der Amylase sich Neutralsalzen, Säuren und Alkalien gegenüber verhält, ob sich hier irgendwelche Differenzen von prinzipieller Bedeutung gegenüber dem verzuckernden Anteil der Diastase erkennen lassen, oder ob ein völliger Parallelismus zwischen beiden besteht.

Von den tierischen Diastasen benutzte ich für meine Versuche ausschließlich die Speicheldiastase, indem ich frisch gewonnenen Speichel entweder unverdünnt oder in zehnfacher Verdünnung verwandte. Als quantitative Methode zur Bestimmung der verflüssigenden Kraft des Speichels bediente ich mich des Verfahrens von *Pollak*[4]). Dasselbe besteht darin, daß man sich zunächst einen dicken, möglichst homogenen Stärkekleister aus Kartoffelstärke herstellt in der Weise, daß man

[1]) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 10, 1908.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **33**, 303, 1911.
[3]) *T. Koga*, ebendaselbst **141**, 410, 1923.
[4]) *Pollak*, Wochenschr. f. Brauerei 1903, S. 595

beispielsweise 25 g Stärke mit etwas Wasser aufschwemmt und das Gemisch in 500 ccm siedendes Wasser einträgt und unter starkem Rühren noch 10 Minuten lang kochen läßt. Es ist natürlich für den Versuch von Wichtigkeit, daß der Kleister möglichst homogen ist. Das erreicht man am besten, indem man während des Siedens ständig umrührt. Nach dem Abkühlen erstarrt der Kleister zu einer zähen Masse und muß deshalb vor der Verteilung auf die einzelnen Reagenzgläser gut angewärmt werden. Der Versuch wird dann so ausgeführt, daß man auf eine Reihe von Reagenzgläsern absteigende Mengen der Fermentlösung gibt und nun zu jedem Gläschen 10 ccm des vorher angewärmten Kleisters zufügt. Die Verteilung derselben macht keine Schwierigkeiten, wenn man stets dieselbe Pipette mit ganz weiter Öffnung benutzt. Die Gläschen kommen dann auf 30 Minuten in ein Wasserbad von 37° C und werden nach Ablauf der Frist auf 5 Minuten in Eiswasser gestellt. Danach wird jedem Gläschen ein Tropfen Phenolphthalein und ein Tropfen verdünnter Natronlauge zugesetzt und nun festgestellt, in welchen Gläschen die Stärke flüssig geblieben, in welchen sie fest geworden ist. Das läßt sich mit Hilfe der Rotfärbung sehr leicht erkennen, insofern, als diejenigen Gläschen, in denen eine vollkommene Verflüssigung der Stärke eingetreten ist, eine homogene Rotfärbung zeigen, während die mit partieller Verflüssigung eine ungleichmäßige Verfärbung aufweisen. Als unterste Grenze der Wirksamkeit galt dasjenige Gläschen, in welchem der Kleister noch vollkommen verflüssigt war, und aus ihm wurde dann die verflüssigende Kraft des Speichels in analoger Weise berechnet, wie dies *Wohlgemuth* für die verzuckernde Kraft angegeben hat. Enthielt z. B. das noch eben wirksame Gläschen 0,025 ccm Speichel, so berechnete sich für 1,0 ccm Speichel die verflüssigende Kraft, ausgedrückt durch die Kubikzentimeter Kleister, in folgender Weise: $0{,}025 : 10 = 1 : x,\ x = \frac{19}{0{,}025} = 400.$ Hiernach wäre die verflüssigende Kraft, deren Wirkung wir mit D_v bezeichnen wollen unter Angabe der Temperatur und der Zeit, bei welcher der Versuch ausgeführt wurde, $D_{v\,30'}^{\,38^0} = 400$. Das würde heißen, daß 1,0 ccm Speichel imstande ist, innerhalb 30 Minuten bei einer Temperatur von 38° C 400 ccm 5proz. Kartoffelkleister zu verflüssigen.

Auf diese Weise untersuchte ich zunächst verschiedene Speichelportionen und fand bei ein und derselben Person keine beträchtlichen Schwankungen. Bisweilen war vor der Nahrungsaufnahme die verflüssigende Kraft stärker als nachher, stets aber zeigte sich ein absoluter Parallelismus zwischen ihr und der verzuckernden Kraft.

Dann studierte ich den *Einfluß von Halogensalzen auf die verflüssigende Kraft* des Speichels, und zwar verwandte ich für die Versuche NaCl, KCl, NaBr, KBr, KJ und NaJ, NaF. Sämtliche Salze

wurden, um die Werte untereinander vergleichen zu können, in n/10 Lösung benutzt. Im einzelnen war die Versuchsanordnung so, daß mehrere Reihen von Reagenzgläsern mit absteigenden Mengen zehnfach verdünnten Speichels[1]) beschickt wurden, die zur Kontrolle dienende Reihe in jedes Gläschen 1,0 ccm destilliertes Wasser erhielt, die anderen Hauptversuchsreihen in jedes Gläschen 1,0 ccm n/10 NaCl bzw. 1,0 ccm n/10 KCl usw. bekamen und nun der Versuch in der oben beschriebenen Weise zu Ende geführt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß in der Tat die Halogensalze gegenüber der verflüssigenden Kraft des Speichels dasselbe Verhalten zeigen wie gegenüber der verzuckernden. Die Chloride und Bromide aktivieren, während die Jodide und Fluoride ohne Einfluß sind. Bemerkenswert dabei ist, daß die Aktivierung der verflüssigenden Kraft durch die Halogensalze eine weit stärkere ist als die der verzuckernden. Wir begegnen hier stets Wirkungsunterschieden, wie sie bei der verzuckernden Diastase bei einer so kurzen Versuchsdauer von 30 Minuten selten beobachtet worden sind. Als Beleg führe ich folgende Versuche an.

Tabelle I.

Fermentmenge (Speichel 1:10)	Kontrolle + 1,0 ccm H_2O			n/10 NaCl + 1,0 ccm			n/10 KCl + 1,0 ccm			n/10 NaBr + 1,0 ccm			n/10 KBr + 1,0 ccm			n/10 KJ 1,0 ccm	n/10 NaF 1,0 ccm
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2	2
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,062	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,032	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
0,016	—	—	—	+	—	—	+	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—
0,008	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$D_v\,{}^{38^0}_{30'}$	200	400	200	6400	3200	3200	6400	6400	3200	6400	3200	1600	6400	6400	1600	400	400

Aus der Tabelle I ersehen wir, daß im Versuche 1 beispielsweise NaCl die Wirkung der Diastase um nicht weniger als das 32fache verstärkt, in dem Versuche 3 um das 16fache und im Versuche 2 um das 8fache. Dieselbe kräftige Aktivierung wird durch KCl erzielt und ebenso durch NaBr und KBr, während n/10 KJ und n/10 NaF ohne nennenswerten Effekt waren.

Sodann untersuchten wir den *Einfluß zweiwertiger Halogensalze*, und zwar $BaCl_2$, $CaCl_2$ und $MgCl_2$. Auch diese Salze ließ ich in

[1]) Die Reaktion zehnfach mit Wasser verdünnten Speichels beträgt in allen von uns daraufhin untersuchten Fällen $p_H = 7,1$, war also eine nahezu neutrale.

n/10 Lösungen auf den Speichel einwirken und konnte bei ihnen gleichfalls eine starke Aktivierung konstatieren, wie aus der Tabelle II ersichtlich ist.

Tabelle II.

Fermentmenge (1 : 100)	Kontrolle H_2O 1,0 ccm		n/10 $BaCl_2$ 1,0 ccm		n/10 $CaCl_2$ 1,0 ccm		n/10 $MgCl_2$ 1,0 ccm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+
0,062	—	—	+	+	+	+	+	+
0,032	—	—	+	+	+	+	+	+
0,016	—	—	+	+	+	—	+	—
0,008	—	—	—	—	—	—	—	—
$D_v \frac{38^0}{30'}$	800	800	6400	6400	6400	3200	6400	3200

Wir sehen hier enorme Steigerungen der verflüssigenden Kraft, wie sie in dem Maße bei einer so kurzen Versuchsdauer von 30 Minuten nie bei der verzuckernden Kraft des Speichels beobachtet werden. Verglichen mit den Werten, die wir bei den einwertigen Halogensalzen beobachtet haben, bewegen sie sich in den gleichen Größenordnungen. Im Anschluß hieran prüfte ich das *Verhalten des Speichels unter dem Einfluß von verdünntem Serum.* Wir haben schon oben darauf hingewiesen, daß Serum die tierische Diastase in ihrer verzuckernden Kraft ganz erheblich fördert und es lag deshalb nahe, zu vermuten, daß auch die verflüssigende Kraft des Speichels von ihm aktiviert wird. In der Tat konnte ich das in meinen Versuchen feststellen und führe als Beleg nur je zwei Versuche mit 10- und 100fach verdünntem Serum an. Die Verdünnungen wurden stets mit destilliertem Wasser vorgenommen und daneben Parallelversuche mit 1proz. NaCl-Lösung ausgeführt. Natürlich wurde auch stets eine Kontrolle von Serum allein ohne Fermentlösung angesetzt, die aber immer ein negatives Resultat ergab.

Entsprechend seinem Verhalten gegenüber der verzuckernden Kraft des Speichels sehen wir das Serum auch den verflüssigenden Anteil erheblich verstärken; auch hier übertrifft die aktivierende Kraft des Serums erheblich die des Kochsalzes und es genügt schon ein Zusatz von ganz minimalen Mengen Serum zum Speichel, um diese Wirkung zu erzielen.

Ich habe nun weiter untersucht, wie *die verflüssigende Kraft der Diastase sich in einem Speichel verhält, der durch ausgiebige Dialyse von seinen Salzen möglichst befreit ist.* Wir wissen aus früheren Arbeiten,

Tabelle III.

Fermentmenge (1 : 10)	Kontrolle		1 proz. NaCl 1,0 ccm		Serum (10fach) 1,0 ccm		Serum (100fach) 1,0 ccm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+
0,062	—	—	+	+	+	+	+	+
0,032	—	—	—	+	+	+	+	+
0,016	—	—	—	—	+	+	+	+
0,008	—	—	—	—	—	—	—	—
$D_v \frac{38^0}{30'}$	800	800	1600	3200	6400	6400	6400	6400

daß, wenn man Speichel dialysiert, die verzuckernde Kraft bis auf einen ganz geringen Anteil inaktiv wird und daß, wenn man die Dialyse des Speichels so lange fortsetzt, bis sämtliche Salze aus ihm verschwunden sind, auch die Diastase nahezu völlig unwirksam wird. Das geht sowohl aus den Untersuchungen von *Wohlgemuth* wie von *Michaelis* und *Pechstein*[1]) hervor. Es war nun von Interesse zu untersuchen, wie die verflüssigende Kraft sich in einem salzfreien Speichel verhält.

Zu dem Zwecke wurde frischer Speichel in kleinen Pergamenthülsen (*Schleicher* und *Schüll*) gegen fließendes Wasser bis 3 Tage dialysiert unter Zusatz von Toluol und danach auf seine verflüssigende Kraft untersucht. Dabei zeigte sich, daß dieselbe zwar an Wirkung sehr beträchtlich abgenommen, aber durchaus nicht verschwunden war. Man konnte noch deutlich im ersten Gläschen der Reihe (1,0 ccm) bei der kurzen Versuchsdauer von 30 Minuten eine gute Verflüssigung beobachten. Selbst wenn ich die Dialyse über eine noch längere Zeit ausdehnte — in einem Falle dialysierte ich ununterbrochen 6 Tage —, sah ich niemals ein völliges Verschwinden der verflüssigenden Kraft, während eine verzuckernde Wirkung schon nach dreitägiger Dialyse kaum noch zu beobachten war. Ich würde es nicht für gerechtfertigt halten, nun hieraus den Schluß zu ziehen, daß die verflüssigende und die verzuckernde Kraft zwei verschiedene Fermente sind. Man könnte sich den Ausfall des Dialysierversuches auch so erklären, daß die verflüssigende Komponente, wie ich schon oben auseinandersetzte, zu ihrer Wirkungsäußerung ein so kleines Quantum braucht, wie es für die verzuckernde nicht mehr ausreicht, um so viel reduzierende Substanz zu liefern, daß man diese mit Hilfe einer der Reduktionsmethoden erkennen kann. Genau wie bei dem

[1]) *Michaelis* und *Pechstein*, diese Zeitschr. **59**, 77, 1914.

verzuckernden Anteil wirken nun die Halogensalze gegenüber der verflüssigenden Komponente im dialysierten Speichel. Wenn man zu einem dialysierten Speichel, der seine verflüssigende Kraft bis auf einen ganz kleinen Anteil eingebüßt hat, Kochsalzlösung zufügt, so erlangt er nicht nur seine ursprüngliche Kraft wieder, sondern sie wird noch entsprechend dem höheren NaCl-Gehalt weit überholt. Es hat sich herausgestellt, daß schon ganz minimale Mengen NaCl genügen, um diese Wirkung zu erzielen. So gelang es mir festzustellen, daß noch 1,0 ccm n/2000 Kochsalzlösung imstande war, die verflüssigende Kraft des Speichels schon deutlich zu verstärken, wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist.

Tabelle IV.
Versuch mit dialysiertem Speichel.

Fermentmenge (unverdünnt)	Kontrolle + 1,0 ccm H_2O	+ n/10 NaCl 1,0 ccm	+ n/100 NaCl 1,0 ccm	+ n/1000 NaCl 1,0 ccm	+ n/2000 NaCl 1,0 ccm	+ n/4000 NaCl 1,0 ccm
1,0	+	+	+	+	+	+
0,5	—	+	+	+	+	—
0,25	—	+	+	+	+	—
0,125	—	+	+	+	—	—
0,062	—	+	+	—	—	—
0,032	—	+	+	—	—	—
0,016	—	+	—	—	—	—
0,008	—	+	—	—	—	—
0,004	—	—	—	—	—	—
$D_v \frac{38^0}{30'}$	10	12 800	3200	800	400	10

Wenn wir die NaCl-Konzentration für die Reihe berechnen, der wir 1,0 ccm n/2000 NaCl zugesetzt haben und in der wir noch eine deutliche Aktivierung konstatieren konnten, so ergibt sich eine solche von nur 0,000 29 Proz., also nur eine ganz minimale, chemisch kaum definierbare Spur.

Ein gleichzeitig durchgeführter Versuch zur Messung der verzuckernden Kraft mit demselben dialysierten Speichel unter Verwendung der gleichen NaCl-Konzentrationen ergab in Übereinstimmung mit *Wohlgemuth*, daß schon bei einem Zusatz von 1,0 ccm n/1000 NaCl bei einer Versuchsdauer von 30 Minuten eine Aktivierung sich nicht mehr erkennen ließ. Die Erklärung für diese Divergenz dürfte wohl darin zu suchen sein, daß die verzuckernde Kraft der Diastase als das weniger empfindliche Agens eine größere Kochsalzmenge verlangt als die empfindsamere verflüssigende Kraft.

Wenngleich aus allen diesen Versuchen mit großer Wahrscheinlichkeit hervorging, *daß bei den bisher untersuchten Neutralsalzen das Halogenion der wirksame Faktor war*, so wollte ich doch auch

experimentell feststellen, ob diese Vermutung tatsächlich zutrifft. Der beste und bequemste Weg, dies zu erreichen, schien mir der zu sein, den *Wohlgemuth* seinerzeit eingeschlagen hat, um für den verzuckernden Anteil den Beweis dafür zu erbringen. Dementsprechend ging ich so vor, daß ich zunächst den Einfluß eines Neutralsalzes prüfte, bei dem die einzelnen Komponenten sich durch Na und Cl auswechseln ließen. Als solches wählte ich K_2SO_4 und stellte zuvörderst fest, daß dieses Salz ebensowenig auf die stärkeverflüssigende Kraft der Diastase wirkt wie auf die verzuckernde. Sodann wurde frischer Speichel mit destilliertem Wasser auf das Zehnfache verdünnt und nun gleichzeitig fünf Versuchsreihen angesetzt. Zur ersten Reihe, die als Kontrolle diente, wurde je 1,0 ccm H_2O zu jedem Gläschen zugefügt, zur zweiten je 1,0 ccm n/10 K_2SO_4, zur dritten je 1,0 ccm n/10 Na_2SO_4, zur vierten je 1,0 ccm n/10 KCl und zur fünften je 1,0 ccm n/10 NaCl. Dann wurden sämtliche Gläschen mit je 10 ccm 5proz. Stärkekleister beschickt, gut durchgeschüttelt und auf 30 Minuten in ein Wasserbad von 38° C gebracht. Nach Ablauf der Frist wurden sämtliche fünf Reihen in Eiswasser gestellt und nun jede Reihe kontrolliert, wie weit die Verflüssigung gegangen war. Dabei stellte sich heraus, daß in der zweiten und dritten Reihe also in Gegenwart von K_2SO_4 und Na_2SO_4 die Verflüssigung nicht weiter gegangen war als in der Kontrollreihe, daß dagegen in den Cl-Reihen die Wirkung ganz gewaltig gesteigert war, wie aus der Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V.

Fermentmenge (1 : 10)	Kontrolle + 1,0 ccm H_2O	n/10 K_2SO_4 1,0 ccm	n/10 Na_2SO_4 1,0 ccm	n/10 KCl 1,0 ccm	n/10 NaCl 1,0 ccm
1,0	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
0,125	—	—	—	+	+
0,062	—	—	—	+	+
0,032	—	—	—	+	+
0,016	—	—	—	+	+
0,008	—	—	—	—	—
$D_v\frac{38^0}{30'}$	400	400	400	6400	6400

Außer den oben genannten Halogensalzen prüfte ich noch *das Verhalten anderer Neutralsalze der verflüssigenden Kraft gegenüber*, und zwar *$NaNO_3$, $NaNO_2$ und KCSN.*

Über die *Wirkung des Natriumnitrats der* **verzuckernden** *Kraft* der Diastase gegenüber gehen die Ansichten noch auseinander; *Wohlgemuth* und *Bang* fanden einen fördernden Einfluß, während *Michaelis* und *Pechstein* beim nicht dialysierten eine hemmende, beim salzfreien Speichel eine fördernde Wirkung beobachteten.

Ich habe zunächst einmal diese Versuche wiederholt und an drei verschiedenen Speichelportionen den Einfluß $NaNO_3$ auf die verzuckernde Kraft mit der Methode von *Wohlgemuth* untersucht. Das Neutralsalz kam in einer Konzentration von n/10 Lösung zur Anwendung. Dabei stellte sich heraus, daß in einem Falle das Natriumnitrat die Wirkung des Speichels um das Doppelte verstärkte, in einem anderen Falle ohne Einfluß war, und in einem dritten Falle die Diastasewirkung etwas hemmte. Man findet also die Wirkung dieses Salzes auf die verzuckernde Kraft des Speichels schwankend und es ist nicht unwahrscheinlich, daß, wie *Michaelis* und *Pechstein* glaubten, der Salzgehalt des Speichels hier von Einfluß ist. Damit würde auch übereinstimmen die Beobachtung von *Wohlgemuth*, daß, wenn man sich aus einem Pankreaspräparat (Pancreatin Rhenania) eine 1proz. wässerige Lösung herstellt, die so gut wie frei von Salzen ist, und auf diese Natriumnitrat einwirken läßt, dann der Effekt ein besonders großer ist. *Michaelis* und *Pechstein* glauben diese Erscheinung so erklären zu können, daß die Diastase, wie das schon vor ihnen *Bang* für das Kochsalz und die Phosphate angenommen hatte, mit dem $NaNO_3$ eine salzartige Bindung eingeht und auf diese das NaCl weit weniger aktivierend wirkt als in Abwesenheit von $NaNO_3$, ja daß, obwohl $NaNO_3$ und NaCl jedes für sich die Diastase stark aktivieren, beide zusammen sich in ihrer fördernden Wirkung nicht nur nicht summierten, sondern geradezu schädigten. Da die vorher mitgeteilten Versuche mit nativem Speichel keine befriedigende Entscheidung in dieser Frage gebracht hatten, untersuchte ich den Einfluß beider Neutralsalze an einer möglichst salzfreien Diastaselösung.

Als solche verwandte ich, wie das schon *Wohlgemuth* tat, eine 1proz. wässerige Lösung eines hochaktiven Pankreaspräparates — ich benutzte Pancreatinum activum von der Firma Brückner und Lampe —, durch mehrmaliges Filtrieren bekam ich eine gut wirksame wasserklare Lösung, deren Reaktion bei $p_H = 7{,}0$ lag, also ganz neutral war. Mit dieser Lösung setzte ich fünf Versuchsreihen an. In der ersten wurde die Diastase in Abwesenheit eines Salzes bestimmt, in der zweiten in Gegenwart von je 1,0 ccm n/10 NaCl und in der dritten in Gegenwart von je 1,0 ccm n/10 $NaNO_3$. Diese drei Reihen dienten als Kontrollen. Nun wurde eine Versuchsreihe in der Weise angesetzt, daß ich nach der Fermentverteilung zu jedem Gläschen zunächst 1,0 ccm n/10 NaCl zusetzte, die Reihe 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen ließ, dann zu jedem Gläschen 1,0 ccm n/10 $NaNO_3$ zufügte und dann 5,0 ccm 1proz. Stärkelösung hinzugab. Gleichzeitig wurde eine andere Fermentreihe zunächst mit 1,0 ccm $NaNO_3$, nach 15 Minuten langem Stehen bei Zimmertemperatur mit je 1,0 ccm n/10 NaCl beschickt und dann 1proz. Stärkelösung zugegeben. In den drei Kontrollreihen wurden die Flüssigkeitsdifferenzen vor dem Zusatz der Stärkelösung mit destilliertem Wasser ausgeglichen und dann zu gleicher Zeit mit der vierten und fünften Reihe in ein Wasserbad von 38° C gebracht. Nach einstündigem Verweilen wurde der Versuch unterbrochen und in der üblichen Weise zu Ende geführt. Das Resultat teile ich in der Tabelle VI mit.

Tabelle VI.

Fermentlösung	2,0 ccm H_2O	1,0 ccm n/10 NaCl + 1,0 ccm H_2O	1,0 ccm n/10 $NaNO_3$ + 1,0 ccm H_2O	1,0 ccm n/10 NaCl + 1,0 ccm n/10 $NaNO_3$	1,0 ccm n/10 $NaNO_3$ + 1,0 ccm n/10 NaCl
1,0	+	+	+	+	+
0,5	—	+	+	+	+
0,25	—	+	+	+	+
0,125	—	—	—	+	+
0,062	—	—	—	—	±
0,032	—	—	—	—	—
$D_v\,{}^{38^0}_{1h}$	5	20	20	40	40

Aus der Tabelle VI ersehen wir, daß in beiden Fällen das Gemisch von n/10 NaCl + n/10 $NaNO_3$ sich in seiner Wirkung nicht nur nicht gehemmt hat, wie man nach *Michaelis* und *Pechstein* hätte erwarten sollen, sondern *im Gegenteil* erheblich gefördert hat. Besonders stark war die Förderung in der Reihe, in der wir zur Fermentlösung zuerst das Nitrat, dann das Chlorid zugegeben hatten. — Auch was *Michaelis* und *Pechstein* bezüglich der Wirksamkeit der einzelnen Komplexverbindungen angeben, trifft nach obigem Versuche jedenfalls *nicht* für alle Fälle zu. So bildet nach ihnen die Diastase mit NaCl einen Cl-Komplex, der extrem stark wirksam ist, mit $NaNO_3$ einen Nitratkomplex, der viel weniger wirksam ist. Wir sehen aber, daß die Aktivierung mit $NaNO_3$ (Reihe 3) um nichts schlechter ist als mit NaCl (Reihe 2), wenn man eine stark verdünnte Pankreatinlösung zum Versuche verwendet. Danach hat es den Anschein, als wenn bei den von *Michaelis* und *Pechstein* am dialysierten Speichel gemachten Beobachtungen auch andere in ihm enthaltene Substanzen, wie z. B. das beigemengte Mucin, irgend eine Rolle gespielt haben.

Ich untersuchte nun die Wirkung von $NaNO_3$ auf die verflüssigende Kraft des Speichels und konnte in allen Fällen ohne Ausnahme eine Aktivierung derselben feststellen; sie betrug das 4- bis 16fache des normalen Speichels. Ganz besonders stark war die Aktivierung von dialysiertem Speichel, hier beobachtete ich eine Verstärkung sogar um das 64fache.

Sodann prüfte ich, ob auch die verflüssigende Kraft durch die Gegenwart von NaCl in ihrer Aktivierung durch $NaNO_3$ gehemmt wird. Ich konnte aber in keinem Falle eine solche konstatieren. Als Beleg führe ich folgende Versuche mit nativem Speichel an.

Wir sehen im Falle 3 ein Gleichbleiben der Wirkung, im Falle 2 sogar eine deutliche Verstärkung. Diese Versuche wurden des öfteren durchgeführt, aber niemals konnte eine gegenseitige Hemmung der Kochsalzwirkung durch $NaNO_3$ beobachtet werden.

Tabelle VII.

Fermentmenge	Kontrolle + 1,0 ccm H_2O			n/10 $NaNO_3$ 1,0 ccm			n/10 NaCl 1,0 ccm		n/10 $NaNO_3$ + n/10 NaCl	
	1	2	3	1	2	3	2	3	2	3
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,025	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,0125	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+
0,0062	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
0,0032	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+
0,0016	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
$D_v{}^{38^0}_{30'}$	200	800	400	1600	3200	1600	3200	3200	6400	3200

Neben $NaNO_3$ wurde auch $NaNO_2$ auf seine Wirkung untersucht und dabei festgestellt, daß dieses Salz auch aktiviert, aber in weit geringerem Grade als $NaNO_3$. Rhodankalium war in jedem Falle ohne Einfluß auf die verflüssigende Kraft des Speichels, sei es, daß ich salzhaltigen oder salzfreien Speichel zum Versuche verwandte.

Bezüglich des Sulfations haben wir bereits oben gesehen, daß es bei nicht dialysiertem Speichel keine Aktivierung bedingt. Wenn ich es dagegen auf salzfreien Speichel wirken ließ, beobachtete ich jedesmal eine nicht unbeträchtliche Verstärkung. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Bang* und *Michaelis* und *Pechstein*, die beim dialysierten Speichel eine geringe Beschleunigung durch das Sulfat feststellen konnten.

Alsdann untersuchte ich den *Einfluß von Alkalien und Säuren* auf die verflüssigende Kraft des Speichels, um festzustellen, ob auch sie schon so geringen Mengen gegenüber empfindlich ist wie verzuckernde Kraft. Dabei zeigte sich, daß ihre Empfindlichkeitsgrenze deutlich höher liegt, während nach *Wohlgemuth* noch n/2500 Natriumcarbonatlösung und n/5000 NaOH eine deutliche Hemmung bedingen, habe ich bei der verflüssigenden Kraft in dieser Konzentration noch keinen hemmenden Einfluß beobachten können. Für Soda trat ein solcher erst bei einer Konzentration von n/500 auf, für NaOH erst in einer Konzentration von n/1000. Dementsprechend war auch der schädigende Einfluß von Na_2CO_3 und NaOH kein so intensiver wie bei der verzuckernden Kraft.

Ganz analog fielen Versuche aus, die darauf abzielten, festzustellen, ob auch gegenüber verdünnter Lösung von HCl die verflüssigende Kraft weniger empfindlich als die verzuckernde ist. Auch hier waren stärkere Konzentrationen erforderlich, sowohl um eine Hemmung, wie um eine Schädigung zu bewirken als bei dem verzuckernden Anteil der Diastase.

Die hier mitgeteilten Versuche waren in der Absicht angestellt, zu ermitteln, ob sich zwischen der verzuckernden und verflüssigenden Kraft der Diastase irgendwelche prinzipielle Unterschiede bezüglich ihres Verhaltens Neutralsalzen, Alkalien und Säuren gegenüber zeigen würden, um auf diese Weise einen Beitrag zu der oben erörterten Frage von der Qualität der Amylase zu liefern. Es hat sich nun ergeben, daß ein weitgehender Parallelismus zwischen beiden Fermentwirkungen besteht. So haben wir gesehen, daß alle Chloride die verflüssigende Kraft der Amylase ebenso aktivieren wie die verzuckernde. Es tritt hier sogar der aktivierende Einfluß noch stärker zutage als bei jener. Denn ich habe schon bei ganz kurzer Versuchsdauer Verstärkungen um das 16- bis 32fache beobachtet. Dem entspricht auch der Befund, daß NaCl schon in einer so geringen Konzentration die verflüssigende Kraft verstärkt, in der bei gleicher Versuchsdauer an der verzuckernden noch keine Spur einer Aktivierung zu konstatieren ist. Dieses Verhalten darf aber nicht im Sinne einer Differenz bewertet werden, sondern es ist nur der Ausdruck dafür, daß die verflüssigende Kraft ein viel feineres Reagens auf das Chlorion ist als die verzuckernde. In diesem Sinne muß auch die starke Aktivierung durch das Bromion aufgefaßt werden.

Weiterhin hat sich gezeigt, daß jodhaltige Neutralsalze ebenso ohne Einfluß auf die verflüssigende Kraft sind wie auf die verzuckernde, und das gleiche gilt auch für Fluornatrium.

$NaNO_3$ und $NaNO_2$ bewirken wie bei dem verzuckernden so auch bei dem verflüssigenden Anteil der Diastase eine erhebliche Verstärkung, hier noch in weit höherem Grade als bei jener, was wohl auch damit zu erklären ist, daß die verflüssigende Kraft ein weit feineres Reagens auf die Nitrationen ist als die verzuckernde. Auch die Sulfate zeigten der verflüssigenden Kraft gegenüber dasselbe Verhalten wie der verzuckernden; im nativen Speichel blieben sie wirkungslos, im dialysierten aktivierten sie deutlich.

Bezüglich des Verhaltens Alkalien gegenüber zeigte auch die verflüssigende Kraft eine große Empfindlichkeit, doch war sie nicht ganz so groß wie bei der verzuckernden. Das gleiche konnte auch gegenüber der Salzsäure festgestellt werden. Diese geringe Abweichung erklärt sich wohl daraus, daß die verflüssigende Kraft nicht ganz so abhängig von dem Milieu ist wie die verzuckernde. Das haben ja die Dialysierversuche gezeigt. Denn wenn ich Speichel 6 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysierte, war mit der halbstündigen Methode eine deutliche Verflüssigung des Stärkekleisters zu beobachten, während eine Verzuckerung mit der üblichen Methodik überhaupt nicht mehr zu konstatieren war. Sie war aber dann noch nachweisbar, wenn wir die Stärkelösung in beträchtlicher Verdünnung anwandten und den Versuch auf 24 Stunden ausdehnten.

Es hat sich somit in allen Punkten ein völliger Parallelismus zwischen verflüssigender und verzuckernder Kraft ergeben, und es hat sich nichts ermitteln lassen, was auf einen prinzipiellen Unterschied zwischen beiden Fermentwirkungen hinweist. Trotzdem möchte ich hieraus nicht den Schluß ziehen, daß beide Kräfte Wirkungsäußerungen ein und desselben Ferments sind. Andererseits möchte ich aber betonen, daß der Beweis für eine gegenseitige Unabhängigkeit beider Wirkungen voneinander in überzeugender Weise bisher noch nicht erbracht ist. Das würde erst dann der Fall sein, wenn es gelänge, den verzuckernden Anteil so von dem verflüssigenden zu trennen, daß er nicht mehr imstande ist, Stärkekleister zu verflüssigen, wohl aber gelöste Stärke zu verzuckern. Der umgekehrte Weg, den verflüssigenden Anteil so rein darzustellen, daß er gelöste Stärke nicht mehr verzuckert, kann leicht in die Irre führen. Denn hier liegt die Möglichkeit vor, daß die verzuckernde Wirkung übersehen wird, wenn man nicht mit ganz dünner Stärkelösung arbeitet und die Versuchszeit nicht lang genug wählt.

Versuche mit Malzdiastase.

Im Anschluß an meine Untersuchungen mit menschlicher Diastase untersuchte ich das Verhalten der stärkeverflüssigenden Kraft einer pflanzlichen Diastase und wählte als solche die des Malzes. Wir wissen aus den Untersuchungen von *Wohlgemuth* und von *Koga*, daß ein prinzipieller Unterschied in dem Verhalten der verzuckernden Kraft der pflanzlichen gegenüber der tierischen Diastase besteht insofern, als erstere in keiner Weise von den Halogensalzen aktiviert wird und auch Zusatz von Serum zur pflanzlichen Diastase ohne jeden Einfluß bleibt, während die tierische Diastase in ihrer Wirkung stark aktiviert wird. Ich habe oben gezeigt, daß auch die verflüssigende Kraft der tierischen Diastase sich ganz analog verhält, und es war nun von Interesse, zu ermitteln, wie pflanzliche Diastase in Gegenwart von Halogensalzen wie von Serum Stärkekleister verflüssigt.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei dem obigen Versuch. Es wurden für die Versuche nur die bei tierischer Diastase wirksamsten, nämlich NaCl, KCl, NaBr und KBr verwandt. Ich stellte mir zunächst aus getrocknetem Malz einen 5proz. wässerigen Extrakt her, indem ich 5 g Malz in der Reibeschale fein verrieb, mit 100 ccm aqua dest. anrührte und einige Zeit bei Zimmertemperatur unter häufigem Verreiben stehen ließ. Der Extrakt wurde dann abfiltriert und mit ihm eine Kontrollreihe in der Weise angesetzt, daß auf eine Reihe von Reagenzgläschen absteigende Mengen der Fermentlösung verteilt, zu jedem Gläschen 1,0 ccm H_2O und dann zu allen je 10 ccm 5proz. Stärkekleister zugegeben wurden. In den anderen Reihen war die Ferment- und Kleisterverteilung die gleiche und variiert wurden nur die Halogen-

salze, die ich in einer Konzentration von n/10 überall zusetzte. Es zeigte sich in keinem einzigen Falle eine Aktivierung der verflüssigenden Kraft der Malzdiastase. Auch wenn ich Serum zusetzte, konnte ich nicht den geringsten Einfluß konstatieren.

Ich habe hier also bei der verflüssigenden Kraft der Malzdiastase genau das gleiche indifferente Verhalten den Halogensalzen und dem Serum gegenüber beobachtet wie bei der verzuckernden. Wie man also bei einer verzuckernden Diastase unbekannter Herkunft mit Hilfe eines Halogensalzes, wie z. B. NaCl, KCl usw. oder mit Hilfe von Serum in kürzester Frist feststellen kann, ob es sich um eine tierische oder pflanzliche Diastase handelt, ebenso kann man das für eine Fermentlösung bestimmen, die vorwiegend stärkeverflüssigende Eigenschaft besitzt. Dieser Satz bedarf allerdings einer gewissen Einschränkung insofern, als nach der soeben erschienenen Mitteilung von *Haehn* und *Schweigart*[1]) die Kartoffelamylase auch durch Neutralsalze aktiviert werden kann. Es wird deshalb die nächste Aufgabe sein, festzustellen, welche pflanzliche Diastasen dem Typus der Malzdiastase und welche dem Typus der Kartoffelamylase angehören.

Widerstand der Diastase gegen Hitze.

Während ich mich bisher vorwiegend mit dem Verhalten der stärkeverflüssigenden Kraft der Diastase beschäftigt habe, folgen nunmehr ausschließlich *Untersuchungen über die verzuckernde Wirkung der Diastase* tierischer sowohl wie pflanzlicher, die sich erstrecken auf ihr Verhalten gegenüber hohen Temperaturen in Gegenwart von verschiedenen Substanzen.

Als tierische Diastase verwandte ich wiederum die Speicheldiastase. Meine Untersuchungen waren zunächst einmal darauf gerichtet, festzustellen, wie die Gegenwart von Zuckerlösungen auf das Verhalten von Diastaselösungen beim Erhitzen wirkt. Aus den Untersuchungen von *Wohl* und *Glimm*[2]) wissen wir, daß Zusatz von Zuckerlösungen zu Malzdiastase die verzuckernde Kraft derselben beim Erhitzen schützt. Die größte Schutzwirkung weist die Maltose auf, dann folgen Traubenzucker, Invertzucker und Dextrin, die in ihrer Wirkung etwa gleich sind, schwächer schützt Rohrzucker und am schwächsten Stärke.

Ich untersuchte nun, ob diese Zuckerarten auch auf tierische Diastase beim Erhitzen einen Schutz auszuüben imstande sind, und stellte meine Versuche an mit Rohrzucker, Lävulose, Maltose und Glucose. Für sämtliche Versuche verwandte ich eine 40proz. Zuckerlösung und führte jeden Versuch so aus, daß ich Speichel und Zuckerlösung mischte im Verhältnis 2 : 2, 2 : 4 und 2 : 8, und als Kontrolle

---

[1]) *Haehn* und *Schweigart*, diese Zeitschr. **143**, 5/6, 1923.
[2]) *Wohl* und *Glimm*, ebendaselbst **27**, 349, 1910.

2 ccm Speichel mit den entsprechenden Mengen Wasser versetzte und nun sämtliche Portionen zunächst 60 Minuten auf 60° C erhitzte. In einer zweiten Versuchsreihe wurde der gleiche Versuch bei 120 Minuten langem Erhitzen auf 60° C ausgeführt.

Das Resultat gebe ich zunächst in Form der Tabelle VIII wieder.

Tabelle VIII.

Zuckerart	60′ bei 60° C				120′ bei 60° C			
	Kontrolle	2:2	2:4	2:8	Kontrolle	2:2	2:4	2:8
Rohrzucker . .	160	320	320	160	80	320	—	320
Lävulose	160	320	320	320	80	320	320	160
Maltose	160 80	160 640	320 640	320 640	80	320	320	320
Glucose	160	320	320	320	40	160	320	320

Die hier mitgeteilten Zahlen sind so gewonnen, daß das Resultat in den einzelnen Versuchsreihen nach der Vorschrift von *Wohlgemuth* ($d_{30'}^{38^0}$) berechnet wurde. Es zeigt sich hier deutlich, daß ebenso wie bei der Malzdiastase auch bei der Speichelamylase die einzelnen Zuckerarten schützend gegen die Zerstörung durch Hitze wirken. Am wirksamsten erwiesen sich die Maltose und Glucose, während die anderen in ihrer Schutzwirkung nicht wesentlich untereinander differierten. Bisweilen beobachtete ich, daß, wenn die Zucker in besonders starker Konzentration zur Anwendung kamen (2 : 8), die Schutzwirkung anscheinend eher schlechter als besser ausfiel (s. Versuch mit Rohrzucker und Lävulose). Das beruht aber vermutlich darauf, daß die Zucker in so starker Konzentration die Diastase in ihrer Wirkung bisweilen hemmen können.

Andererseits habe ich gelegentlich die Beobachtung gemacht, daß in schwacher Konzentration einzelne Zuckerarten die Diastase aktivieren können, und ich überlegte, *ob nicht Aktivierung und Schutz vor Hitzezerstörung zwei Faktoren sind, die in naher Beziehung zueinander stehen.* Wenn diese Vermutung richtig war, so mußten Substanzen, welche die Diastase aktivieren, auch imstande sein, dieselbe beim Erhitzen vor der Zerstörung zu schützen. Es lag nahe, zunächst einmal die Wirkung von Kochsalz daraufhin zu untersuchen.

Ich stellte den Versuch so an, daß ich 1,0 ccm frischen Speichel mit 5,0 ccm n/10 NaCl und gleichzeitig zur Kontrolle 1,0 ccm Speichel mit 5,0 ccm H_2O 30 Minuten lang bei 65° C erhitzte. Danach wurde in der Kontrolle das fehlende Kochsalz ergänzt und nun in beiden Portionen die Diastase in der üblichen Weise bei einer Versuchsdauer von 30 Minuten bestimmt. Das Resultat war, daß, während in der Kontrolle sich keine Spur von Diastase mehr feststellen ließ, die Kochsalzportion noch deutliche Mengen an Diastase aufzuweisen hatte. So

betrug der Wert in einem Versuche $d_{30'}^{38^0} = 8$, in einem anderen 16; in den entsprechenden Kontrollen war der Wert gleich Null.

Wenn es sich hier um eine Gesetzmäßigkeit handelte und dieselbe bedingt war durch die Gegenwart des Cl-Ions, so müßten sämtliche Cl-haltigen Neutralsalze einen Schutz beim Erhitzen ausüben, und nicht bloß diese, sondern auch die anderen halogenhaltigen Neutralsalze, die fördernd auf die Diastase wirken. Es müßten also außer $NaCl$ auch KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $BaCl_2$ und ferner die Bromide schützend wirken, nicht dagegen KJ; denn Jodkalium wirkt nicht oder nur äußerst schwach aktivierend auf die Diastase.

Alle diese Neutralsalze wurden nun auf ihre schützende Kraft gegenüber der Speichelamylase untersucht. Ich ging dabei so vor, daß ich 1,0 ccm Speichel mit der betreffenden Salzlösung, die ich stets in einer Konzentration von n/10 anwandte, auf das Sechsfache verdünnte und 30 Minuten lang in einem Wasserbade einer Temperatur von 65° C aussetzte. Zur Kontrolle wurde 1,0 ccm Speichel mit 5,0 ccm destillierten Wassers versetzt und in demselben Wasserbade 30 Minuten gehalten. Nach Ablauf der Frist wurde zum Ausgleich der Salzkonzentration 5,0 ccm n/10 der betreffenden Salzlösung der Kontrolle zugesetzt, während die Hauptportion zum Ausgleich der Verdünnung 5,0 ccm H_2O erhielt. In beiden Portionen wurde dann die Diastase in der üblichen Weise quantitativ bestimmt. Dabei zeigte sich, daß, während in der Kontrolle stets die Diastase vollkommen vernichtet war, die salzhaltigen Portionen immer noch beträchtliche Diastasemengen erhielten. Die Versuche wurden des öfteren wiederholt und ergaben stets das gleiche Resultat. Ich will mich aber damit begnügen, nur je zwei Versuche mit jedem Salz hier mitzuteilen.

Neutralsalze	Versuch 1 ($d_{30'}^{38^0}$)	Versuch 2 ($d_{30'}^{38^0}$)	Neutralsalze	Versuch 1 ($d_{30'}^{38^0}$)	Versuch 2 ($d_{30'}^{38^0}$)
n/10 $NaCl$ . .	176	88	n/10 $BaCl_2$ . .	352	704
n/10 KCl . .	176	176	n/10 $CaCl_2$ . .	352	1408
n/10 KBr . .	176	88	n/10 $MgCl_2$ . .	352	352
n/10 KJ . . .	0	0			

Wir sehen, daß die zweiwertigen Salze stärker schützen als die einwertigen und daß von den zweiwertigen das Calciumsalz die stärkste Schutzwirkung ausübt. Es scheint hiernach, als wenn auch die Kationen nicht ohne Einfluß auf die Hitzewirkung sind, und es würde sich vielleicht verlohnen, einmal in dieser Richtung die Versuche fortzusetzen.

Die Schutzwirkung von Jodkalium war entsprechend seiner Unfähigkeit, die Diastase zu aktivieren, gleich Null. Diese Schutzversuche

habe ich sodann auch mit dialysiertem Speichel wiederholt und hier die gleichen Resultate erhalten wie mit dem nativen Speichel. Solche Erhitzungsversuche wurden auch in Gegenwart von stark verdünntem Serum vorgenommen in der Weise, daß 2 ccm sechsfach verdünnter Speichel mit 4 ccm 100fach verdünntem Serum gemischt und in der Kontrolle 2 ccm Speichel derselben Verdünnung mit 4,0 ccm destillierten Wassers vereinigt wurden. Beide Portionen wurden 30 Minuten bei 65° C gehalten und dann auf ihren Diastasegehalt untersucht, nachdem auch die Kontrolle noch die entsprechende Serummenge erhalten hatte. Dabei zeigte sich, daß in dem Hauptversuche noch deutliche Diastasewirkung festzustellen war, während die Kontrolle völlig wirkungslos geworden war. Also auch 100fach verdünntes Serum schützt die Diastase vor gänzlicher Zerstörung. Allerdings müssen wir berücksichtigen, daß das Serum, selbst wenn es mit Wasser 100fach verdünnt wird, noch als eine kolloidale Lösung angesehen werden muß.

Von kolloidalen Lösungen wissen wir aber, daß sie einen gewissen Schutz für Ferment vor der Zerstörung bieten. Aber dieser Schutz kann nur von einer an Kolloiden reichen Lösung ausgeübt werden. Da von einer solchen hier keine Rede sein kann, muß man annehmen, daß in diesem Falle der Serumaktivator es war, der seine schützende Wirkung auf die Diastase ausgeübt hat.

Wir hatten oben gesehen, daß ebenso wie die Halogensalze und das Serum auch $NaNO_3$ befähigt ist, die Diastase zu aktivieren. Es war deshalb interessant, das Verhalten auch dieses Salzes bezüglich seiner Schutzwirkung auf erhitzten Speichel zu untersuchen. Wenn obiger Satz, daß alle aktivierenden Salze gleichzeitig auch schützend auf die Diastase wirken, richtig war, so mußte auch $NaNO_3$ die Diastase vor ihrer Zerstörung durch Hitze schützen. Um jede andere Salzwirkung auszuschalten, verwandte ich für diese Versuche Speichel, den ich durch mehrtägige Dialyse von seinen Salzen so gründlich wie möglich befreit hatte. Dann stellte ich mir eine Mischung von Speichel mit n/10 $NaNO_3$ im obigen Verhältnis her, zur Kontrolle eine mit Wasser entsprechend verdünnte Speichelportion und erhitzte beide 30 Minuten lang bei 65° C. Das Resultat war, daß in beiden Portionen die Diastase vollkommen zerstört war. $NaNO_3$ ist demnach nicht befähigt, die Diastase vor der Hitzeschädigung zu schützen, wie z. B. $NaCl$. Dieser Versuch wurde des öfteren wiederholt, stets mit dem gleichen Resultat.

Wie soll man sich diesen Gegensatz zwischen den beiden Salzen, die sich doch in bezug auf ihr Aktivierungsvermögen sehr nahe zu stehen scheinen, erklären? Eine befriedigende Antwort auf diese Frage zu geben, ist sehr schwer, zumal man ja gar nichts weiß sowohl bezüglich des Zustandekommens einer Schutzwirkung beim Erhitzen noch bezüglich der inneren Vorgänge, die sich bei der Aktivierung abspielen.

Die von *Bang* und von *Michaelis* und *Pechstein* postulierte Bindung der Salze an das Ferment macht die Sachlage keinesfalls klarer, ganz abgesehen davon, daß sie durchaus hypothetisch und noch durch nichts bewiesen ist. Nehmen wir aber einmal an, daß diese Erklärung zutrifft, so könnten wir für den vorliegenden Fall das eine jedenfalls sagen, daß das Nitration sich zu dem Fermentkomplex anders verhalten muß als das Chlorion und das ihm in der Wirkung sehr nahestehende Bromion. Daß Cl und Br sich auch sonst in der Zellfunktion gegenseitig ergänzen können, ist eine bekannte Tatsache. Ich erinnere nur an das interessante Experiment von *Wohlgemuth*[1]) an einem Hunde mit *Pawlow*schem kleinen Magen. Wird ein solches Tier eine Zeitlang völlig salzfrei mit gründlich ausgekochtem Fleisch ernährt, so versiegt allmählich die Magensaftsekretion vollkommen und aus dem Blindsack fließt ein spärliches schleimiges Sekret, das keine Spur von freier Salzsäure mehr enthält. Wenn man dann dem Hunde in diesem Stadium Bromnatriumlösung per os zuführt, so ergießt sich aus dem Blindsack wieder ein normales Sekret, das reich an freier Salzsäure ist, ein Beweis, daß das in den Zellen fehlende Cl durch Br substituiert werden kann. Ebenso habe ich auch in meinem Falle gesehen, daß beim Erhitzungsversuch Cl durch Br ersetzt, dieselbe kräftige Schutzwirkung entfaltet. Da im Gegensatz dazu das Nitration sich als ein geradezu schädigender Faktor erwiesen hat, müssen wir daraus schließen, daß auch die von ihm bedingte Aktivierung anderer Art sein muß als die des Cl und des Br.

Weiterhin war aus dem oben formulierten Satze von der Beziehung zwischen Aktivierung und Schutzkraft zu folgern, daß im Gegensatz zu tierischer Diastase die Halogensalze ohne Einfluß auf die Erhitzung pflanzlicher Diastase sein mußten. Denn da pflanzliche Diastase durch die Halogensalze nicht aktiviert wird, durfte sie auch beim Erhitzen vor der Vernichtung durch sie nicht geschützt werden. Meine Versuche stellte ich mit Malzdiastase an, die ich mir stets frisch bereitete, und ließ auf sie die einzelnen Salze in der gleichen Weise und in der gleichen Konzentration beim Erhitzen einwirken. Ich sah in keinem einzigen Falle eine Schutzwirkung auftreten; im Gegenteil, es zeigte sich, daß die Gegenwart von all diesen Salzen mehr oder weniger stark schädigend auf die Malzdiastase während des Erhitzens wirken.

So schädigten $NaCl$ und KCl stärker als KBr und $CaCl_2$; besonders intensiv war die Schädigung durch $NaNO_3$, während KNO_3 weniger stark wirkte. Auf die Mitteilung von Zahlen möchte ich in Rücksicht auf den bemessenen Raum verzichten. Nach Abschluß unserer Versuche werden wir auf die Arbeit von *Ernström*[2]) aufmerksam, der den

[1]) *Wohlgemuth*, Arbeiten aus dem pathologischen Institut der Universität Berlin, Festschrift, 1906.

[2]) *Ernström*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **119**, 190, 1923.

Einfluß allerdings nur von NaCl auf die Hitzebeständigkeit tierischer und pflanzlicher Diastase untersucht hat und zu dem gleichen Resultat wie wir gekommen war.

Zusammenfassung.

1. Die verflüssigende Kraft der tierischen Diastase wird in der gleichen Weise durch Neutralsalze aktiviert wie die verzuckernde. In vorderster Reihe stehen die Halogensalze und von diesen wiederum an erster Stelle die Chloride und die Bromide, während die Jodide und Fluoride ohne Einfluß sind. Als der wirksame Faktor hat sich das Cl- bzw. Bromion erwiesen.

2. Auch mit Wasser auf das 100fache verdünntes Serum ist befähigt, die verflüssigende Kraft der Diastase ebenso zu verstärken wie die verzuckernde.

3. Durch Dialyse des Speichels gelingt es nicht, die verflüssigende Kraft vollkommen unwirksam zu machen; es tritt nur eine starke Abschwächung der Wirkung ein, die aber durch Zusatz von Cl- oder Br-Salzen wieder in vollem Umfange und darüber hinaus zur Entfaltung kommt.

4. Das Nitration ist ebenso imstande, den verflüssigenden Anteil der Diastase zu aktivieren wie den verzuckernden, gleichgültig, ob man salzhaltigen oder dialysierten Speichel zum Versuche verwendet; besonders intensiv ist seine Wirkung dialysiertem Speichel gegenüber. Als schwächer wirksam erwies sich das Nitrition.

5. Das Sulfation ist ohne Einfluß auf nativen Speichel; bei dialysiertem Speichel angewandt, aktiviert es die verflüssigende Kraft ebenso wie die verzuckernde.

6. Alkalien und Säuren gegenüber zeigt die verflüssigende Kraft des Speichels ungefähr das gleiche Verhalten wie die verzuckernde.

7. Malzdiastase verhält sich sämtlichen obigen Salzen gegenüber bezüglich seiner verflüssigenden Kraft ebenso refraktär wie bezüglich der verzuckernden.

8. Die verzuckernde Kraft der Speichelamylase kann vor der Zerstörung durch Erhitzen geschützt werden durch die Gegenwart von Maltose und Glucose, nicht ganz so gut durch Rohrzucker und Lävulose.

9. Auch NaCl ist imstande, einen wirksamen Schutz auszuüben und ebenso alle anderen Chloride, desgleichen auch die Bromide, nicht dagegen die Jodide.

10. Ebenso ist 100fach verdünntes Serum imstande, einen Schutz vor der Hitze zu gewähren.

11. Das Nitration ist dagegen nicht imstande, die Diastase vor der Hitzezerstörung zu schützen.

12. Malzdiastase wird durch die Gegenwart von Chloriden und Bromiden während des Erhitzens nicht nur nicht geschützt, sondern im Gegenteil geschädigt.

Über das Verhalten von Zuckerarten in verdünnt alkalischer Lösung.

I. Mitteilung:

Die Ursache der Glucoseumlagerung in verdünnter Kaliumhydroxydlösung.

Von

J. Groot.

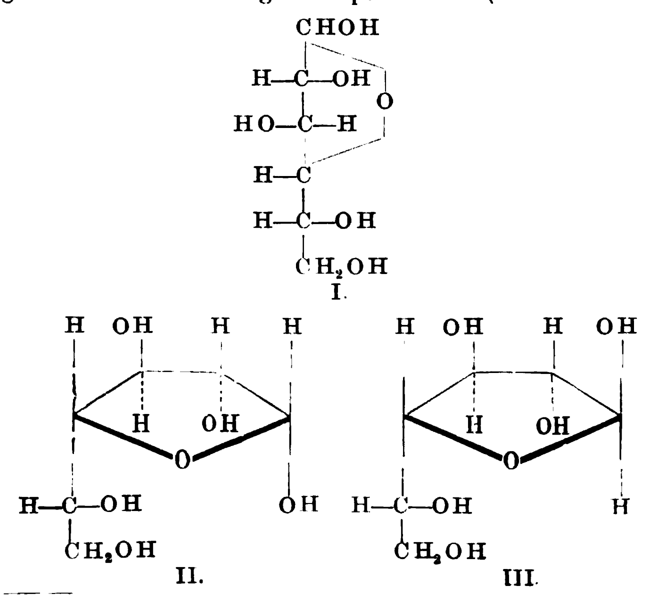
(Aus dem Laboratorium für chemische Technologie der Technischen Hochschule Delft.)

(Eingegangen am 17. Januar 1924.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Bekanntlich kann d-Glucose in zwei Formen vorkommen. Während aus heißem Pyridin die β-Form auskristallisiert[1]), scheidet sich aus wässeriger Lösung die α-Form bei niedriger Temperatur aus (und zwar als Hydrat)[2]).



I.

II. III.

[1]) R. Behrend, Ann. **377**, 220, 1910.

[2]) C. Tanret, C. r. **120**, 1061, 1895.

Schreiben wir d-Glucose als (I)[1]), so müssen wir der α-Glucose die Formel (II) und der β-Glucose die Formel (III) zuerkennen.

Wenn man die Glucose, mit der wir gewöhnlich arbeiten, in Wasser löst, so ist eine Änderung der optischen Drehung der frischen Lösung zu beobachten, nämlich eine Abnahme, bis eine bestimmte Rotation zustande kommt. Dieser Erscheinung der Mutarotation liegt der Übergang der α-Glucose in eine Gleichgewichtsmischung von α- und β-Glucose zugrunde[2]), und dieser Übergang geht bei Siedehitze schnell vor sich[3]). Werden kleine Mengen Alkali zugegeben, so veranlassen sie eine augenblicklich verlaufende Mutarotation[4]), so daß die gewöhnliche Gleichgewichtsmischung der zwei Modifikationen sofort entsteht. Beiläufig sei bemerkt, daß letzteres auch der Fall ist, wenn man von β-Glucose ausgeht, und weiter, daß alle sogenannten reduzierenden Zuckerarten die Erscheinung der Mutarotation aufweisen[5]).

Es wird sich in dieser Abhandlung um Erscheinungen handeln, welche auftreten, wenn einer zuvor gekochten Glucoselösung eine KOH-Lösung zugegeben worden ist. Es versteht sich, daß alle Änderungen, welche mit dem Zucker stattfinden, ihren Ausgangspunkt in der ursprünglichen Gleichgewichtsmischung der α- und β-Glucose haben.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Veränderungen, welche Glucose in verdünnter Kalilauge erleidet, zu verschiedenen anderen Hexosen führen; diese wurden von Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein isoliert[6]). Letztere hatten die Veränderungen entdeckt, weil diese von einer allmählichen Rotationsabnahme der Flüssigkeit begleitet wurden[7]).

Vorliegende Studie über die Ursache der Glucoseumlagerung beruht auf meinen Beobachtungen der Drehungsänderungen[8]).

Experimenteller Teil.

1. *Die plötzliche Rotationserniedrigung der Glucose bei Zusatz von Kalilauge.*

Beim Zusammenfügen einer Glucoselösung und einer verdünnten Kaliumhydroxydlösung ist zu erwarten, daß die Rotation der Mischung nicht konstant bleibt, sondern allmählich abnimmt. Es war bei meinen Versuchen auffällig, daß man kurz nach dem Mischen eine Rotation

---

[1]) Vgl. z. B. J. C. Irvine, Journ. Chem. Soc. **123**, Trans. 899, 1923.

[2]) J. Böeseken, Versl. d. Kon. Akad. v. Wet. Amsterdam **21**, 163—164, 1912; **24**, 1624—1625, 1916; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **46**, 2621—2626, 1913; Beknopte Scheik. d. Suikers (Delft 1918), S. 56—59.

[3]) Dubrunfaut, C. r. **23**, 42, 1846.

[4]) Vgl. B. Tollens und C. Schulze, Ann. **271**, 51, 1892.

[5]) In dieser Zeitschrift findet sich eine Übersicht über die Mutarotation von B. Bleyer und H. Schmidt, **138**, 119—122, 1923.

[6]) C. A. Lobry de Bruyn und W. Alberda van Ekenstein, Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas **14**, 162 und 203ff., 1895; **16**, 258 und 275ff., 1897; Versl. d. Kon. Akad. **4**, 122, 1895; Ber. **28**, 3078—3079, 1895.

[7]) *Dieselben*, Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas **14**, 158, 1895; vgl. auch S. 157 und Versl. d. Kon. Akad. **4**, 122, 1895.

[8]) Über die de Bruyn-van Ekensteinsche Umlagerung erschien eine Übersicht von L. Kolb, diese Zeitschr. **63**, 1—5, 1914.

ablas, welche nicht aus der regelmäßigen Abnahme des Drehungsvermögens der Flüssigkeit erklärt werden konnte.

Wenn man die Flüssigkeit im Saccharimeter untersucht, muß man darauf schließen, daß das Drehungsvermögen im Abnehmen begriffen ist, das anfängliche Drehungsvermögen aber von der Anwesenheit des Kaliumhydroxyds beeinflußt wird. War doch dieses kleiner, als es sich für die reine wässerige Glucoselösung berechnen und beobachten läßt.

Tabelle I.

Rotationsablesungen (bei Zimmertemperatur in 200,0-mm-Röhren) von Mischungen eines Volumens Glucoselösung (Rotation = 42,7° V. für die genannte Rohrlänge) und eines gleichen Volumens KOH-Lösung der angegebenen Normalität.

$t_n - t_0$ Min.	0 n (Wasser)	0,005 n	0,01 n	0,025 n	0,05 n	0,10 n	0,15 n	0,20 n	0,25 n	0,30 n	0,35 n
	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
1	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,1	18,5	18,0	17,6	17,3
2	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,1	18,5	18,0	17,6	17,3
3	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,1	18,5	18,0	17,6	17,3
4	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,0	18,5	17,9	17,6	17,3
5	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,0	18,4	17,9	17,6	17,3
6	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,1	18,4	17,9	17,5	17,3
7	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,0	18,4	17,9	17,6	17,2
8	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,0	18,4	17,9	17,5	17,2
9	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,6	19,0	18,4	17,9	17,5	17,2
10	21,3	21,2	21,1	20,9	20,4	19,7	19,0	18,4	17,9	17,5	17,2
11	21,3	21,2	21,1	20,9	20,5	19,7	19,0	18,4	17,8	17,5	17,2
12	21,3	21,2	21,1	20,8	20,4	19,6	19,0	18,4	17,8	17,5	17,2
13	21,3	21,2	21,1	20,9	20,4	19,6	19,0	18,3	17,8	17,5	17,2
14	21,3	21,2	21,1	20,9	20,4	19,6	18,9	18,3	17,8	17,5	17,2
15	21,3	21,2	21,1	20,8	20,4	19,6	19,0	18,3	17,8	17,5	17,1

Es geht aus Tabelle I hervor, daß nach dem Zusammenfügen der gleichen Volumina Glucoselösung und verdünnter Kalilauge bei der ersten Ablesung — also eine Minute nach dem Mischen — die Drehung der anwesenden Glucose schon um ein bedeutendes gesunken ist. Die darauf folgenden Ablesungen, in den Beispielen jedesmal nach einer Minute ausgeführt, zeigen nur eine sehr langsame Rotationsabnahme.

Zwar ist bei schwächeren Konzentrationen von KOH die Rotation des Zuckers um ein kleines gefallen, aber sie behält während der Beobachtungszeit den anfänglichen Wert[1]).

[1]) Die von mir benutzte Glucose war reine (meistens anhydrische) Glucose und das Kaliumhydroxyd war ein gewöhnliches Mercksches Hydroxyd. Vgl. diese Zeitschr. **139**, 191 bzw. 194. Es wurde gearbeitet in einem Halbschattenapparat mit Ventzkescher Skala und doppeltem Quarzkeile von Schmidt und Haensch.

Tabelle II.

Anfangsrotationen und Rotationserniedrigungen von Kaliumhydroxyd enthaltenden Glucoselösungen (Rohrlänge = 200,0 mm; Zimmertemperatur). Die Glucose für sich dreht 21,3° V.; Molarität = 0,387.

[KOH][1]	r_0	Δ	[KOH]	r_0	Δ	[KOH]	r_0	Δ
0,05 n	20,5	0,8	0,25 n	18,0	3,3	0,55 n	16,6	4,7
0,10 n	19,7	1,6	0,30 n	17,6	3,7	0,65 n	16,6	4,7
0,15 n	19,1	2,2	0,35 n	17,3	4,0	0,75 n	16,6	4,7
0,20 n	18,5	2,8	0,45 n	16,9	4,4	0,90 n	16,6	4,7

Abb. 1. Änderung von Δ mit der KOH-Konzentration für eine Glucosekonzentration 0,387 molar. (Rohrlänge = 200,0 mm; Zimmertemperatur).

Für noch andere Laugekonzentrationen bei der Glucosekonzentration von Tabelle I, ferner auch für andere Glucosekonzentrationen, ist der Einfluß des anwesenden Kaliumhydroxyds untersucht worden.

Ich fand die Anfangsrotation der alkalihaltigen Flüssigkeiten, indem ich möglichst bald nach dem Mischen von 10 ccm Glucoselösung und 10 ccm Kalilösung die Drehung während

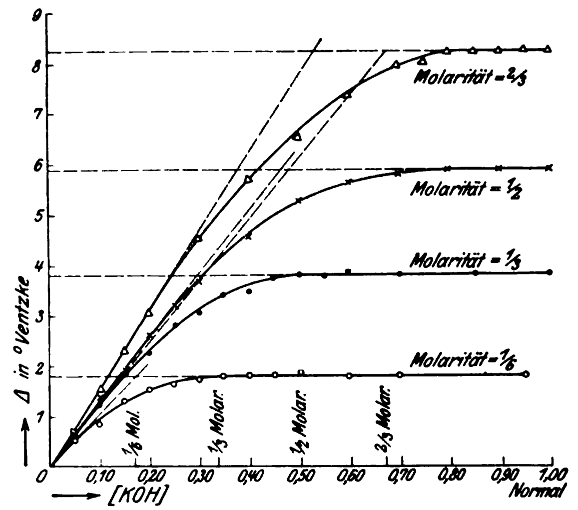


Abb. 2. Änderung von Δ mit der KOH-Konzentration für verschiedene Glucosekonzentrationen. (Rohrlänge = 200,0 mm; Zimmertemperatur).

[1]) Mit [] ist hier die Konzentration überhaupt gemeint.

der allerersten Stadien der eintretenden Umlagerungsreaktion verfolgte. Die Drehung wurde dann auf den Zeitpunkt des Mischens extrapoliert. In Tabelle II und Abb. 1 sind die Anfangsrotationen (r_0) und die Rotationserniedrigungen (Δ) zusammengestellt für diejenige Konzentration, bei der Glucose als solche in einem 200,0-mm-Rohre 21,3° Ventzke rotierte.

Tabelle III.

Anfangsrotationen und Rotationserniedrigungen von Kaliumhydroxyd enthaltenden Glucoselösungen (Rohrlänge = 200,0 mm; Zimmertemperatur).

Glucosemolarität = 1/6			Glucosemolarität = 1/3			Glucosemolarität = 1/2			Glucosemolarität = 2/3		
[KOH]	r_0	Δ	[KOH]	r_0	Δ	[KOH]	r_0	Δ	[KOH]	r_0	Δ
0 n	9,1	0	0 n	18,3	0	0 n	27,5	0	0 n	36,8	0
0,05 n	8,5	0,6	0,05 n	17,6	0,7	0,05 n	26,8	0,7	0,05 n	36,0	0,8
0,10 n	8,2	0,9	0,10 n	17,0	1,3	0,10 n	26,1	1,4	0,10 n	35,2	1,6
0,15 n	7,8	1,3	0,15 n	16,45	1,85	0,15 n	25,55	1,95	0,15 n	34,4	2,4
0,20 n	7,55	1,55	0,20 n	16,0	2,3	0,20 n	24,85	2,65	0,20 n	33,7	3,1
0,25 n	7,45	1,65	0,25 n	15,45	2,85	0,25 n	24,25	3,25	0,30 n	32,25	4,55
0,30 n	7,35	1,75	0,30 n	15,2	3,1	0,30 n	23,8	3,7	0,40 n	31,05	5,75
0,35 n	7,3	1,8	0,35 n	14,85	3,45	0,40 n	22,9	4,6	0,50 n	30,25	6,55
0,40 n	7,3	1,8	0,40 n	14,8	3,5	0,50 n	22,2	5,3	0,60 n	29,4	7,4
0,45 n	7,3	1,8	0,45 n	14,55	3,75	0,60 n	21,85	5,65	0,70 n	28,8	8,0
0,50 n	7,25	1,85	0,50 n	14,6	3,8	0,70 n	21,7	5,8	0,75 n	28,75	8,05
0,60 n	7,3	1,8	0,55 n	14,6	3,8	0,80 n	21,6	5,9	0,80 n	28,55	8,25
0,70 n	7,3	1,8	0,60 n	14,5	3,9	0,90 n	21,6	5,9	0,85 n	28,55	8,25
0,95 n	7,3	1,8	0,70 n	14,6	3,8	1 n	21,6	5,9	0,90 n	28,55	8,25
			0,85 n	14,6	3,8				0,95 n	28,5	8,3
			1 n	14,6	3,8				1 n	28,55	8,25

Tabelle III enthält die Angaben für Glucose-Laugemischungen, die 1/6, 1/3, 1/2 und 2/3 molar an Glucose sind. Für 100proz. anhydrische Glucose berechnet man die Drehungen der rein wässerigen Lösungen auf 9,09, 18,20, 27,34 und 36,52° V. bei einer Temperatur von 17° C[1]).

In Abb. 2 ist die Erniedrigung der Glucosedrehung als Funktion der KOH-Konzentration dargestellt. Von einer bestimmten Kaliumhydroxydkonzentration an erreicht Δ einen konstanten Wert. Die Resultate berechtigen zu folgender Schlußfolgerung: Für verschiedene Konzentrationen von Glucose nimmt Δ mit der KOH-Konzentration zu; der Grenzwert, den Δ erreicht, ist der in der Lösung vorhandenen Glucosemenge etwa proportional; er beträgt $\pm$ 2/9 der Glucoserotation in reinem Wasser.

[1]) Berechnet mittels der Tollensschen Formel, vgl. z. B. R. Frühling, Rohmaterialien usw. 1916, S. 5, oder B. Tollens, Kurzes Handb. d. Kohlenhydrate 1914, S. 175. Für p wurde aber die Anzahl Gramme in 100 ccm genommen.

2. Die allmähliche Drehungsabnahme einer verdünnt alkalischen Glusoselösung.

Wenn man die Drehung einer mit KOH alkalisch gemachten Glucoselösung von Minute zu Minute verfolgt, kommt man zu der Überzeugung, daß die Rotationsabnahme sehr regelmäßig fortschreitet, und daß Drehungsschwankungen nicht auftreten. Diese Drehungsabnahme spiegelt die Änderung, welche die Glucose unter dem Einfluß des verdünnten Kaliumhydroxyds erleidet, wider. Abb. 3 zeigt bei einer bestimmten Glucosekonzentration unter dem Einfluß verschiedener KOH-Konzentrationen das Bild der Drehungsverminderung während eines gewissen Zeitverlaufs. Es ist dabei zu bemerken, daß die Glucosekonzentration diejenige der Tabelle II und der Abb. 1 ist, und daß deshalb auch die Anfangsdrehungen diejenigen der genannten Tabelle und Abbildung sind. Werden doch diese Anfangsdrehungen kaum verschieden sein bei 25⁰ oder bei Zimmertemperatur. Für ein Polarimeterrohr mit einer rein wässerigen Glucoselösung (ein Rohr mit nicht ganz gefüllter Seitentube) wurden folgende Drehungen gefunden: bei 25,0⁰C 42,7⁰V.; bei 15,0⁰C 42,8⁰V.; bei 5,0⁰C 42,9⁰V. Das heißt, man findet hier so geringe Unterschiede, daß sie aus dem Dilatationsvermögen der Flüssigkeit erklärt werden können.

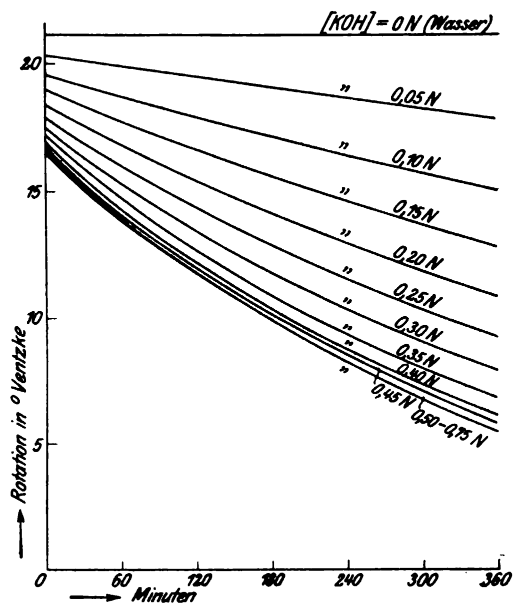


Abb. 3. Die allmähliche Drehungsabnahme einer 0,387 molaren Glucoselösung unter dem Einfluß von KOH. (Rohrlänge 200,0 mm; Temperatur 25,0⁰C.)

Die Versuche wurden ausgeführt in Mantelröhren von 200,0 mm Länge[1]). Aus der größeren Neigung der Linien bei größerer Laugekonzentration schließt man, daß die Geschwindigkeit, mit welcher die Rotation abnimmt, um so größer ist, je mehr KOH in der Lösung anwesend ist. Wenn aber die KOH-Konzentration so groß geworden ist, daß für die anfängliche Rotationserniedrigung der Grenzwert erreicht ist (von $\pm$ n/2 KOH an), wird zugleich eine gleiche Drehungs-

[1]) Die Arbeitsweise war im wesentlichen die in dieser Zeitschr. **187**, 519 und 520 beschriebene; vgl. auch **189**, 191.

abnahme mit der Zeit gefunden. Mit anderen Worten: die Geschwindigkeit der Drehungsabnahme nimmt mit wachsendem Δ zu, bis sie einen Grenzwert erreicht, wenn die anfängliche Drehung minimal ist und Δ also den größten Wert hat.

3. Die Umwandlung der Glucose, welche der Rotationsabnahme zugrunde liegt.

Die optische Drehung der kalihaltigen Glucoselösungen nimmt allmählich ab, bis eine praktisch inaktive Flüssigkeit entstanden ist[1]). Schließlich kann man geringe Linksdrehungen beobachten[2]). Welche Änderung es ist, die die Glucose während des äußerlich wahrnehmbaren Strebens zur Inaktivation erleidet, ist mir einstweilen noch nicht in Einzelheiten klar. Fortgesetzte Untersuchungen werden dies erhellen müssen.

(Für untenstehendes ist die Mitteilung wichtig, daß ich in einer Reaktionsmischung, welche allmählich eine schwach negative Drehung erhalten hatte, eine von Preßhefe unvergärbare Zuckerart konstatierte, die mutmaßlich Fehlingsche Lösung ziemlich schwer reduziert.)

Der Standpunkt, auf den meine Untersuchungen mich zu stellen nötigen, ist der, daß in den Glucoselösungen, welche in bezug auf KOH verdünnt sind und welche sich inaktivieren, Änderungen auftreten, die nicht die Totalmenge Zucker, wohl aber die Art des Zuckers betreffen.

Zuerst habe ich nämlich die Frage zu lösen versucht, inwiefern die zu beobachtende Drehungsabnahme das Stadium wiedergibt, das die Reaktion erreicht hat. Ich stellte einen Versuch an, um für drei verschiedene Reaktionsmischungen den beobachteten Prozentsatz der ursprünglichen Drehung, die zu jeder Lösung gehörte, mit dem des ursprünglichen Reduktionsvermögens zu vergleichen. Das Reduktionsvermögen wurde gefunden, indem ich es einigemal für eine Menge feststellte, die $\pm\, ^2/_3$ ccm der Reaktionsmischung betrug und nach vorheriger Verdünnung abgemessen wurde. Die alkalischen Zuckerlösungen standen in geschlossenen Fläschchen im Thermostaten bei 25^0 C; die Bestimmungen wurden nach Fehling-Lehmann-Schoorl ausgeführt[3]).

Das ursprüngliche Reduktionsvermögen wurde für eine Mischung einer Glucoselösung mit einem gleichen Volumen Wasser festgestellt, während die Reaktionsmischungen aus der Glucoselösung und einem gleichen Volumen einer KOH-Lösung bereitet wurden.

---

[1]) Vgl. auch de Bruyn und van Ekenstein, Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas. **14**, 163.

[2]) Diese Zeitschr. **189**, 191, Fußnote 1.

[3]) Chem. Weekblad **9**, 687, 1912; **12**, 482 ,1915; vgl. A. W. van der Haar, Nachweis, Trennung und Bestimmung der Monosaccharide, S. 119 bis 122; Berlin 1920.

Die ursprünglichen Drehungen der Flüssigkeiten wurden einzeln bestimmt, wie schon in § 1 beschrieben wurde. Während der Reaktion wurden die Rotationen beobachtet, indem ein Polarimeterrohr von 200,0 mm (bei den dunklen Flüssigkeiten von 100,0 mm) mit der Flüssigkeit gefüllt und die Drehung abgelesen wurde, ohne das Rohr ganz abkühlen zu lassen. 10 ccm des Rohrinhaltes wurden dann abpipettiert, um eine verdünnte Lösung zur Bestimmung des reduzierenden Vermögens herzustellen.

Tabelle IV.

Die Änderung des Reduktionsvermögens einer Kaliumhydroxyd enthaltenden Glucoselösung (Reaktionstemperatur = 25° C).

Zusammensetzung der Flüssigkeit	Anzahl der vergangenen Stunden	Beobachtete Rotation für Rohrlänge 200,0 mm in Grad V.	Zuckermenge in $+\frac{2}{3}$ ccm nach dem Reduktionsvermögen in mg als Glucose ausgedrückt	Zuckermenge in mg als Fructose ausgedrückt	Zuckermenge in mg als Mannose ausgedrückt	Rotation in Prozentzahlen der ursprünglichen	Prozentsatz des Zuckers als Glucose berechnet	Prozentsatz des Zuckers als Fructose berechnet	Prozentsatz des Zuckers als Mannose berechnet
Gleiche Volumina 1/2 mol. Glucoselösung und 0,30 n KOH	0	+ 25,55	**57,2**	62,2	58,8	100	100	108,7	102,8
	1/4	+ 25,2	57,0	62,0	58,7	98,6	99,7	108,4	102,6
	10 1/4	+ 14,75	56,7	61,7	58,4	57,7	99,1	107,8	102,1
	58 1/2	+ 1,2	54,0	58,7	55,4	4,7	**94,4**	**102,6**	**96,9**
	72	— 0,4	51,9	56,6	53,3	—	90,7	99,0	93,2
Gleiche Volumina 1/2 mol. Glucoselösung und 1 n KOH	0	+ 22,2	**57,2**	62,2	58,8	100	100	108,7	102,8
	1/4	+ 21,6	56,9	61,9	58,6	97,3	99,5	108,2	102,4
	3	+ 13,7	56,9	61,8	58,5	61,7	99,5	108,0	102,3
	18	+ 0,6	54,3	59,1	55,8	2,7	**94,9**	**103,3**	**97,5**
	25	zu dunkel gefärbt	50,5	55,0	51,8	—	88,3	96,2	90,6
Gleiche Volumina 1/2 mol. Glucoselösung und 1,70 n KOH	0	+ 21,6	**57,2**	62,2	58,8	100	100	108,7	102,8
	2	+ 15,5	56,9	61,9	58,6	71,7	99,5	108,2	102,4
	12	+ 1,4	50,7	55,2	52,0	6,5	**88,6**	**96,5**	**90,9**
	25	zu dunkel gefärbt	44,4	48,5	45,6	—	77,6	84,8	79,7

Tabelle IV gibt eine Übersicht der Ergebnisse. Die Lösung, welche KOH mit einer Normalität 0,15 enthielt, hatte nach 72 Stunden eine gelbe Farbe angenommen und zeigte nach 53½ Stunden nur 4,7 Proz. der ursprünglichen Drehung. In diesem Zeitpunkte ist das Reduktionsvermögen nur so wenig zurückgegangen, daß diese Abnahme durch Umlagerung der Glucose in andere Zuckerarten entstanden sein kann. Zur guten Übersicht ist das Reduktionsvermögen auf das entsprechende Gewicht an Glucose, Fructose und Mannose zurückgeführt. Nach 72 Stunden könnte man ein Verschwinden der reduzierenden Zucker in Betracht ziehen.

Nach 13 Stunden drehte die Lösung, welche n/2 an KOH war, nur um 2,7 Proz. des ursprünglichen Betrages. Auch jetzt ist an einen stattgefundenen wechselseitigen Übergang der reduzierenden Zucker-

arten zu denken; die Verminderung des Reduktionsvermögens der Reaktionsflüssigkeit ist dadurch erklärlich. Nach 25 Stunden war die Flüssigkeit braun gefärbt und das reduzierende Vermögen wesentlicher zurückgegangen.

Dort, wo mehr KOH anwesend war, nämlich zu 0,85 n, konstatierte ich nach 12 Stunden einen Rotationsrückgang bis auf 6,5 Proz., und wieder wäre an eine teilweise Zerstörung des Zuckers als reduzierenden Stoffes zu denken. Um so eher käme man dazu nach einer Einwirkung von 25 Stunden; die Lösung sah dann dunkelbraun aus.

Ich mache auf die eingeklammerte Bemerkung auf S. 78 aufmerksam und gelange zu folgender Schlußfolgerung: Es findet während des regelmäßigen Strebens zur Inaktivation der Flüssigkeiten nur eine Umlagerung in andere Zuckerarten (Hexosen) statt. Die allmähliche Drehungsabnahme der Glucose in verdünnten Kaliumhydroxydlösungen spiegelt die de Bruyn-van Ekensteinsche Reaktion wider.

4. Die Geschwindigkeit der Umlagerung von Glucose in andere Zuckerarten unter dem Einfluß von KOH.

Für meine Überzeugung, daß die Glucose sich unter dem Einfluß von verdünntem Kaliumhydroxyd auf regelmäßige Weise in eine inaktive Mischung von Monosacchariden (Hexosen) umlagert, kann ich keinen direkten Beweis anführen. Hoffentlich werde ich später den experimentellen Beweis liefern können. Die in großem Überschuß von Wasser stattfindende Umwandlung des Rohrzuckers in Invertzucker unter Säureeinfluß zeigt das Bild einer monomolekularen Reaktion, die kinetisch leicht mittels der Rotationsänderung der Flüssigkeit zu verfolgen ist.

Wenn die Reaktionskonstante k ist, so kann man, um die Inversionsgeschwindigkeit festzustellen, z. B. schreiben:

$$K = 10^4 . 0{,}4343\, k = \frac{10^4}{t_n - t_1} \log_{10} \frac{r_1 - r_\infty}{r_n - r_\infty},$$

wobei t die Beobachtungsmomente und r die beobachteten Rotationen sind[1]).

Von der von Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein entdeckten Umlagerungsreaktion der Glucose in verdünnter Kalilauge habe ich die Geschwindigkeit mittels der Formel

$$K = \frac{10^4}{t_n - t_1} \log_{10} \frac{r_1}{r_n}$$

gemessen[2]).

---

[1]) Diese Zeitschr. **137**, 519.

[2]) Vgl. auch ebendaselbst **139**, 191—193.

Dabei ging ich von der Voraussetzung aus, daß 1. die Änderung, die der Rotationserniedrigung Δ zugrunde liegt, sich den Quantitäten gemäß auf die nicht umgelagerte Glucose und die Umlagerungsprodukte verteilt; und daß 2. die Glucose, trotz der Konzentrationsänderung während der Reaktion, ihr spezifisches Drehungsvermögen unverändert beibehält wegen der Anwesenheit der entstandenen anderen Zucker, wodurch die Totalkonzentration an Zucker unverändert bleibt.

So betrachtet, schreibt man statt

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{\text{ursprüngliche Glucosemenge}}{\text{umlagerungsfähige Glucosemenge}}.$$

$$K = \frac{10^4}{t_n - t_0} \log \frac{r_0 + \Delta}{r_n + \frac{r_n}{r_0}\Delta} = \frac{10^4}{t_n - t_0} \log \frac{r_0}{r_n} \text{ oder } \frac{10^4}{t_n - t_1} \log \frac{r_1}{r_n}.$$

Die **Tabelle V** zeigt einige Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessungen. Sie wurden ausgeführt bei 25,0° C für Flüssigkeiten, die m/2 an Glucose waren und KOH in verschiedenen Konzentrationen enthielten. Es wurden 10 ccm Glucoselösung und 10 ccm verdünnter Kalilauge gemischt, und die Mischung wurde in einer Mantelröhre in den Thermostaten gestellt. Die Reaktionen sind möglichst weit fortgesetzt worden.

Bei näherer Betrachtung der Tabelle wird man die Konstanz von K bemerken. Indem man sich in der hier beschriebenen Weise eine gute Vorstellung von der Reaktionsgeschwindigkeit zu bilden vermag, **stützen die Ergebnisse die Ansicht, daß die Glucose während der Reaktion in verdünnter Kalilauge regelmäßig in eine inaktive Mischung von Monosacchariden — zu denen auch Glucose gehört — übergeht und daß diese Reaktion monomolekular verläuft.**

5. *Die Umlagerungsgeschwindigkeit der Glucose bei verschiedenen Konzentrationen von KOH.*

Über diesen Gegenstand habe ich, wenn auch in anderem Zusammenhang, schon früher etwas mitgeteilt. Unter Hinweis auf meinen vorigen Aufsatz[1]) kann ich mich hier kurz fassen.

Tabelle VI.

Geschwindigkeitskonstanten für eine 0,387 m Glucoselösung bei verschiedenen Alkalitäten (Temperatur = 25,0° C).

[KOH]	0,05 n	0,10 n	0,15 n	0,20 n	0,25 n	0,30 n	0,35 n	0,40 n
K	1,6	3,2	4,8	6,4	8,0	9,6	11,1	12,0

[KOH]	0,45 n	0,50 n	0,55 n	0,60 n	0,65 n	0,70 n	0,75 n
K	12,5	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8

[1]) Diese Zeitschr. **139**, 188, 1923; namentlich S. 192—194.

Tabelle V.

Geschwindigkeitsmessungen an $^{1}/_{2}$ molaren Glucoselösungen und für die angegebenen Normalitäten von KOH.
(Versuchstemperatur = 25,0° C).

Die angegebenen Farben beruhen auf dem Gesichtseindruck während der Beobachtung der 2 dm langen Rohrschicht.

$t_n - t_1$ Minuten nach der ersten Ablesung	0,10 n KOH		0,15 n KOH		0,35 n KOH		0,50 n KOH		0,85 n KOH		1 n KOH		±1,5 n KOH		±2 n KOH	
	r	K	r	K	r	K	r	K	r_1	K	r	K	r	K	r	K
0	26,1	—	25,35	—	22,65	—	21,6	—	21,0	—	20,95	—	21,1	—	21,1	—
45	25,4	2,62	24,4	3,69	20,7	8,69	19,25	11,14	18,5	12,23	18,45	12,27	18,8	11,14	19,2	9,11
105	24,5	2,61	23,1	3,85	18,3	8,82	16,5	11,14	15,6	12,29	15,7	11,93	16,3	10,68	16,8	9,43
165	23,7	2,54	21,9	3,86	16,2	8,83	14,0	11,42	13,1	12,42	13,3	11,96	14,2	10,42	14,9	9,16
													(dunkelbraun)		(dunkelbraun)	
225					14,4	8,74	11,9	11,51	11,0	12,48	11,2	12,09	12,35	10,34	13,25	8,98
285	22,05	2,57	19,65	3,88	12,6	8,94	10,0	11,73	9,15	12,66	9,4	12,22			11,95	8,66
345	21,3	2,56	18,7	3,83	11,1	8,98	8,3	12,04	7,5	12,96	7,9	12,27				
405	20,5	2,59	17,7	3,85	9,7	9,09	6,9	12,24								
465	19,9	2,53	16,8	3,84					5,1	13,21	5,5	12,48				
									(dunkelbraun)		(dunkelbraun)					
525					7,3	9,37	4,5	12,97	4,1	13,51	4,6	12,54				
							(hellbraun)									
585					6,3	9,50	3,5	13,51								
645			14,4	3,81	5,4	9,65	2,6	14,25								
					(braungelb)											
705	17,35	2,52	13,65	3,82												
	(hellgelb)		(gelb)													
1485	11,1	2,50	6,8	3,85												
1785	9,4	2,49	5,25	3,83												
	(braungelb)		(hellbraun)													
2085	8,0	2,46	3,95	3,87												
2925	5,0	2,45	1,65	4,06												
	(hellbraun)		(braun)													

Ich gebe jetzt in Tabelle VI und in Abb. 4 die Resultate von Versuchen, die für eine bestimmte Glucosekonzentration und für wechselnde Laugekonzentrationen ausgeführt sind. Sie deckten den Zusammenhang zwischen K und der KOH-Konzentration auf. Diese Versuche sind mit nicht eigens gereinigtem KOH ausgeführt und dienten früher zur vorläufigen Orientierung. Sie wurden in duplo ausgeführt, in Mantelröhren bei 25,0° C. Diese Polarisationsröhren waren mit einer Mischung, aus 10 ccm einer Glucoselösung und aus 10 ccm verdünnter Kalilauge von verschiedener Normalität hergestellt, gefüllt. Die Molarität der erwähnten Glucoselösung war immer 0,774; ihre Drehung 42,7° V.

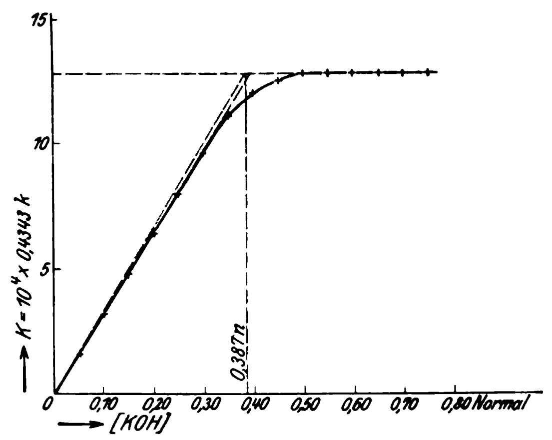


Abb. 4. Änderung von K mit der KOH-Konzentration für eine Glucosekonzentration 0,387 molar. (Temperatur 25,0° C.)

Seitdem habe ich diese Messungen auf höhere KOH-Konzentrationen ausgedehnt, und in Abb. 3 (§ 2) habe ich die Ergebnisse schon auf andere Weise als in Abb. 4 abbilden können.

Während für die schwächeren Laugekonzentrationen K der Konzentration proportional ist, tritt bei den stärkeren eine Abweichung dieser Proportionalität hervor. Findet man doch in diesen Fällen für K einen kleineren Wert, als nach der Proportionalität folgen würde. Bei zunehmender KOH-Konzentration erreicht K sogar einen Maximalwert, was nach den Schlußsätzen von § 2 und § 3 nicht wundernimmt.

Nun ist bemerkenswert, daß der Maximalwert $K = 12{,}8$ beim Fortbestehen der Proportionalität zwischen K und [KOH] erreicht sein würde bei der Laugekonzentration, bei der 1 Mol KOH auf 1 Mol $C_6H_{12}O_6$ einwirken kann. In dieser Hinsicht weist die graphische Abbildung nur eine unbedeutende Abweichung auf.

Wenn N die Normalität von KOH und M die Molarität der Glucose in der Flüssigkeit vorstellt, so könnte man die Proportionalität als $K = \frac{12,8}{M} N$ oder $K = \frac{12,8}{0,387} N$, also $K = 33,1\,N$ berechnen, während die Graphik eine Proportionalität $K = \frac{12,8}{0,395} N$, also $K = 32,4 N$ zeigt.

Man konstatiert also eine maximale Umlagerungsgeschwindigkeit in den Fällen, wo tatsächlich eine molekulare Menge KOH auf die Glucose einwirkt.

6. Die Umlagerungsgeschwindigkeit der Glucose bei wechselnder KOH-Konzentration und verschiedenen Zuckerkonzentrationen.

Letzteres gilt auch bei anderen Glucosekonzentrationen.

Die Änderung der Umlagerungskonstante K mit zunehmender Konzentration an KOH ist für Konzentrationen von 3, 6, 9 und 12 g Glucose pro 100 ccm (bzw. $^1/_6$, $^1/_3$, $^1/_2$ und $^2/_3$ molar) bestimmt worden.

Jedesmal wurden 10 ccm Glucoselösung, wovon die Drehung bzw. 18,3, 36,8, 55,5 und 74,1° V. betrug, mit 10 ccm einer KOH-Lösung von bekannter Normalität gemischt. Nachdem die Flüssigkeit in eine gewöhnliche Polarimeterröhre von 2 dm[1]) eingefüllt war, wurde diese Röhre bei 25,0° C in den Thermostaten gestellt. Nach $\pm$ 15 Min., $\pm$ 3 Stunden und $\pm$ 4 Stunden wurde die Drehung abgelesen, worauf ich von den zwei berechneten Werten für K das Mittel nahm. (Man ist in dieser Weise bei stark auseinandergehenden Laugekonzentrationen praktisch unabhängig von eventuellen Nebeneinflüssen auf die gemessene Geschwindigkeit. Dann berechnet man nämlich gut vergleichbare Reaktionskonstanten. Dieser Gedankengang wird durch die Daten der Tabelle V gestützt.)

Tabelle VII enthält die Ergebnisse für die vier Glucosekonzentrationen und für Laugekonzentrationen von 0 bis 1 n.

Deutlicher sind diese Resultate in der graphischen Vorstellung Abb. 5 zusammengebracht.

Der Maximalwert von K ist für die vier Glucosekonzentrationen fast derselbe:

12,7 für . . . . $^1/_6$ m,
12,8 „ . . . . $^1/_3$ m,
12,9 „ . . . . $^1/_2$ m,
12,9 „ . . . . $^2/_3$ m.

Immer würde dieses Maximum erreicht sein bei Anwesenheit von 1 Mol KOH auf 1 Mol Glucose, wenn keine Abweichung der Pro-

[1]) Diese Zeitschr. **139**, 196.

Tabelle VII.

Geschwindigkeitskonstanten für vier verschiedene Glucosekonzentrationen bei wechselnden Alkalitäten (Versuchstemperatur = 25,0° C).

[KOH]	1/6 molare Glucoselösung			1/3 molare Glucoselösung			1/2 molare Glucoselösung			2/3 molare Glucoselösung		
	3 St. K	4 St. K	Mittel K	3 St. K	4 St. K	Mittel K	3 St. K	4 St. K	Mittel K	3 St. K	4 St. K	Mittel K
0,05 n	3,16	3,23	3,2	1,71	1,85	1,8	1,32	1,31	1,3	0,90	0,94	0,9
0,075 n	5,28	5,09	5,2									
0,10 n	6,52	6,88	6,7	3,67	3,78	3,7	2,42	2,47	2,4	1,86	1,92	1,9
0,125 n	7,71	7,97	7,8									
0,15 n	9,02	9,50	9,3	5,57	5,69	5,6	3,93	3,93	3,9	2,89	2,96	2,9
0,175 n	10,0	10,2	10,1									
0,20 n	11,1	11,1	11,1	7,40	7,19	7,3	5,20	5,23	5,2	3,82	3,84	3,8
0,25 n	11,9	12,1	12,0	8,70	8,91	8,8				4,86	4,89	4,9
0,30 n	12,5	12,7	12,6	10,3	10,2	10,3	7,75	7,79	7,8	5,83	5,99	5,9
0,35 n	12,2	13,0	12,6	11,2	11,5	11,4	8,68	8,89	8,8	6,87	7,00	6,9
0,40 n	12,77	12,72	12,7	12,0	12,3	12,2				8,06	8,02	8,0
0,45 n	12,6	12,8	12,7	12,2	12,6	12,4	10,8	11,1	11,0	8,81	8,85	8,8
0,50 n	12,68	12,58	12,6	12,6	12,9	12,8	11,7	11,9	11,8	9,87	9,84	9,9
0,55 n				12,7	12,8	12,8	12,3	12,5	12,4	10,67	10,69	10,7
0,60 n	12,31	12,38	12,3	12,7	12,9	12,8						
0,65 n							12,8	12,7	12,8	11,66	12,02	11,8
0,70 n	11,9	12,2	12,1	12,6	12,65	12,6	12,8	13,0	12,9	12,19	12,44	12,3
0,75 n							12,8	12,9	12,9	12,51	12,75	12,6
0,80 n				11,9	12,0	12,0	12,7	12,9	12,8	12,80	12,82	12,8
0,85 n										12,77	12,86	12,8
0,90 n							12,4	12,9	12,7	12,77	12,99	12,9
—												
1 n							12,0	12,3	12,2	12,61	12,69	12,7

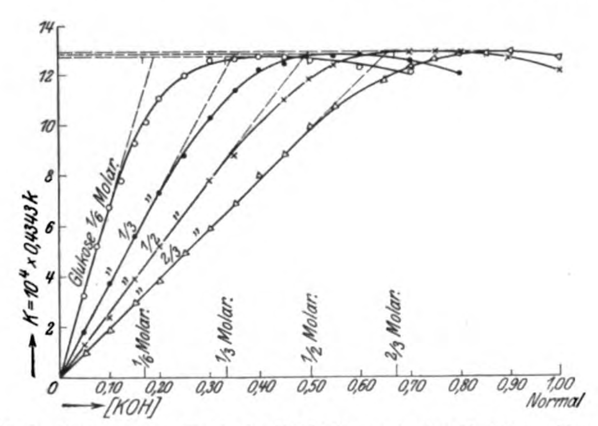


Abb. 5. Änderung von K mit der KOH-Konzentration für Glucoselösungen, welche bzw. 1/6, 1/3, 1/2 und 2/3 molar sind. (Versuchstemperatur 25,0° C.)

portionalität zwischen K und [KOH] bei den verhältnismäßig großen Laugekonzentrationen gefunden würde.

Im allgemeinen, wenn M = die Molarität der Lösung an Glucose, kann — insofern eine Proportionalität besteht zwischen K und der Laugenormalität N — geschrieben werden: $K = \frac{12,8}{M} N$ (bei 25,0° C). Von dieser Regel treten nur kleine experimentelle Abweichungen auf (vgl. auch den vorigen Paragraphen). Wo wirklich eine molekulare Menge KOH auf die Glucose einwirkt, findet man ein K_{max}, das von der ursprünglichen Glucosekonzentration unabhängig ist.

Theoretischer Teil.

Von der katalytischen Rohrzuckerinversion in salzsaurer Lösung kann man sich einen Begriff bilden, wenn man sich die Reaktion als eine Folge von Zusammenstößen von Saccharosemolekeln und Wasserstoffionen oder Chlorwasserstoffmolekeln vorstellt.

Während die Salzsäure sich chemisch nicht ändert, wird die Saccharose unter Wasseraufnahme in Dextrose und Lävulose umgewandelt, wobei sich das Drehungsvermögen umkehrt.

Eine kleine Menge HCl ist imstande, eine große Menge Rohrzucker völlig zu invertieren, und mit steigender Salzsäurekonzentration nimmt die Inversionsgeschwindigkeit für eine bestimmte Zuckerkonzentration fast unbeschränkt zu.

Es besteht aber keine Proportionalität zwischen der Inversionsgeschwindigkeit und der Salzsäurekonzentration, und man hat die Tatsache, daß die Geschwindigkeit stärker zunimmt als die Säurekonzentration, dadurch erklärt, daß man den Wasserstoffionen und den ungespaltenen Chlorwasserstoffmolekeln einen verschiedenen katalytischen Effekt zuerkannte. Bei einer gleichen HCl-Konzentration in Saccharoselösungen mit wechselndem Zuckergehalt wird — abgesehen von dem Eigenvolumen des Zuckers — die Zusammenstoßwahrscheinlichkeit proportional der Zuckerkonzentration zunehmen; dadurch wird die Reaktionskonstante der Inversion dieselbe sein müssen. Wo es schon bei den ersten Messungen der Inversion den Anschein hatte — als man nämlich einen größeren Wert für k fand, je nachdem man die Zuckerkonzentration größer nahm —, als ob letzteres nicht bestätigt würde, da hob eine Korrektion für das eigene Volumen des Zuckers, also eine Zurückführung auf ein gleiches Reaktionsvolumen, den Widerspruch zwischen Theorie und Experiment auf. Unter dem Einfluß einer gleichen Menge HCl findet man für verschiedene Quantitäten Rohrzucker in gleichen Wassermengen eine gleiche Geschwindigkeitskonstante k.

Was nun die Glucoseumlagerung in verdünnten Kaliumhydroxydlösungen betrifft, so meinten die Entdecker der Reaktion, Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein, daß diese katalytisch von den Hydroxylionen verursacht würde[1]).

---

[1]) C. A. Lobry de Bruyn und W. Alberda van Ekenstein, Versl. d. Kon. Akad. 4, 123, 1895; Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas. 14, 158, 203 und 212—213, 1895; Ber. 28, 3078, 3079 und 3080, 1895.

Ihres Erachtens blieb die Menge KOH fast unangegriffen[1]), während die Glucose sich in andere Zucker umlagerte.

Anfangs teilten sie als ihre Ansicht mit, daß die Umlagerung zu einer Mischung von Mannose, Fructose und Glucose führt[2]), später aber fanden sie, daß auch andere Zuckerarten hierbei beteiligt sind[3]).

Während des Übergangs in andere Zucker — welchen ich bei 25°C und Laugekonzentrationen bis 1 n untersuchte — nimmt die Drehung regelmäßig ab und die Flüssigkeit sucht einen optisch inaktiven Zustand zu erreichen.

Es bedarf nur einer geringen Menge KOH, um eine große Glucosemenge umzulagern und zu inaktivieren.

Die allgemein anerkannte Auffassung, daß die Hydroxylionen als solche katalytisch die Umlagerung verursachen, wird von zwei Tatsachen in Abrede gestellt. Später wird sich zeigen, daß beide zusammenhängen.

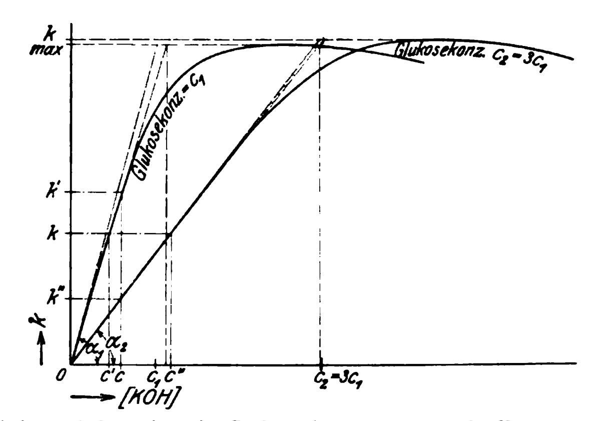


Abb. 6. Abhängigkeit der Reaktionskonstante k von der Konzentration an KOH und an Glucose.

1. erreicht die monomolekulare Reaktionskonstante $k = 1/t \ln r_1/r_n$ der Glucoseumlagerung bei zunehmender KOH-Konzentration ein Maximum;

2. findet man für verschiedene Zuckerlösungen bei gleicher KOH-Konzentration viel kleinere Reaktionskonstanten, je nachdem die Glucosekonzentration größer ist.

Hierbei sei folgendes bemerkt. Falls die Hydroxylionen katalytisch die Umlagerung von Glucose bewirkten, wobei an Zusammenstöße mit den Zuckermolekeln zu denken wäre, so würde schon der anfängliche geradlinige Verlauf der k-Laugekonzentrationskurven Verwunderung erregen.

---

[1]) C. A. Lobry de Bruyn und W. Alberda van Ekenstein, Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas **14**, 158, 1895.

[2]) *Dieselben*, Versl. d. Kon. Akad. **4**, 122, 1895; Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas **14**, 203ff., 1895; Ber. **28**, 3078ff., 1895.

[3]) *Dieselben*, Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas **16**, 258, 275—278, 278—279, 1897.

Bei Konzentrationsänderung des Kaliumhydroxyds wird sich ja auch der Dissoziationsgrad desselben ändern. Den ungespaltenen KOH-Molekeln wäre eine gleich große katalytische Wirkung wie den OH-Ionen selbst zuzuschreiben.

Außerdem würde man eine fortwährende Zunahme der Reaktionskonstante mit wachsender [KOH] erwarten. Das Auftreten des typischen Maximums für Glucoselösungen gibt Anlaß, daß man den Gedanken an eine Wirkung der Hydroxylionen als solcher fallen lassen muß.

Weiter ist auch bei der Glucoseumlagerung von einem rein physikalischen Einfluß des Reaktionsvolumens nichts zu bemerken. Man findet im Gegenteil eine kleinere Umlagerungskonstante, je nachdem die Zuckerkonzentration größer, d. h. das Reaktionsmedium beschränkter ist.

Ich bin der Ansicht, daß die Bildung von Kaliumglucosat $C_6H_{11}O_6K$ und seine Unbeständigkeit in wässeriger Lösung die Ursache der Umlagerungsreaktion ist, welche Glucose in der Hydroxydlösung erleidet. Aus dieser Auffassung läßt sich der Verlauf der k-[KOH]-Kurven erklären (s. Abb. 6).

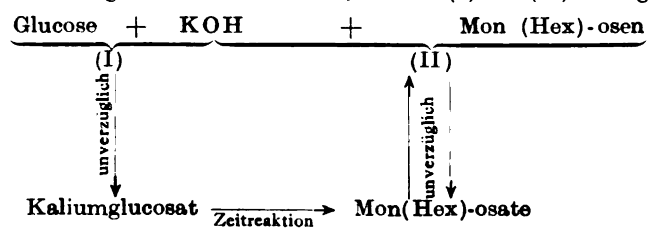
Die Reaktionskonstante der unimolekularen Glucosatumlagerung (nicht der Glucoseumlagerung) muß von der Konzentration an Kaliumglucosat unabhängig sein, anders gesagt: von verschiedenen Mengen Glucosat wandelt sich bei gleicher Temperatur und bei gleicher Zeitdauer ein gleicher Bruchteil um.

Für die Lösungen, bei denen zu Anfang der Reaktion keine freie Glucose, sondern außer KOH nur Glucosat anwesend ist, muß man immer dieselbe Umlagerungskonstante $k = 1/t \ln r_1/r_n$ berechnen.

Keine freie Glucose wird nun in den Lösungen anwesend sein, bei denen ein gewisses Übermaß KOH der äquivalenten Menge zugegeben worden ist. Für diese Lösungen hat k einen Maximalwert und k_{max} ist tatsächlich gleich groß für verschiedene Glucosekonzentrationen.

Weiter ist es erklärlich, daß die Konstante, welche man bei kleineren Laugekonzentrationen für die Glucoseumlagerung findet, der Konzentration an KOH proportional ist und kleiner ist, je nachdem die Glucosekonzentration größer ist.

Ich entwerfe folgendes Reaktionsbild, wobei (I) in (II) übergeht.



Sobald der Glucoselösung KOH zugefügt worden ist, findet die Glucosatbildung statt. Was man bei der Glucoseumlagerung mißt, ist der Übergang von Glucosat in eine Mischung von Monosacchariden. Hierbei wird das KOH teilweise wieder frei, so daß neues Glucosat gebildet und umgelagert wird. Der Geschwindigkeitskoeffizient $k = \frac{dx}{(A-x)dt}$ der Glucoseumlagerung ist dem Verhältnis $\frac{[\text{Kaliumglucosat}]}{[\text{umlagerungsfähige Glucose}]}$ proportional.

Angenommen, daß das KOH sich auf die Quantitäten Glucose und anderer Zucker proportional verteilt, so wird es deutlich, daß das Verhältnis $\frac{\text{[Kaliumglucosat]}}{\text{[umlagerungsfähige Glucose]}}$ während der Reaktion konstant ist, ebenso wie bei der Rohrzuckerinversion das Verhältnis

$$\frac{\text{Zusammenstoßwahrscheinlichkeit}}{\text{[invertierbare Saccharose]}}$$

dasselbe bleibt.

Dies hat zur Folge, daß bei der Umlagerung von Glucose in andere Zucker sich bei gleicher Zeitdauer immer ein gleicher Bruchteil der noch reaktionsfähigen Glucose umsetzt. Der Übergang Glucose $\underset{(KOH)}{\longrightarrow}$ Monosen kann als eine monomolekulare Reaktion verfolgt werden. Experimentell geschieht es also durch Beobachtung einzelner Drehungen während der Inaktivation und durch Berechnung der Reaktionskonstante aus der Formel

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{r_1}{r_n}.$$

Für Lösungen von Glucose in verdünntem Kaliumhydroxyd ist das konstante Verhältnis

$$\frac{\text{[Kaliumglucosat]}}{\text{[umlagerungsfähige Glucose]}} = \frac{\text{ursprüngliche [KOH]}}{\text{ursprüngliche [Glucose]}}.$$

Das heißt k ist der Anfangskonzentration an KOH proportional und der Anfangskonzentration an Glucose umgekehrt proportional. Für eine jede Glucosekonzentration findet man also graphisch eine gerade k-[KOH]-Linie.

Die Abweichung dieser Proportionalität zwischen k und [KOH] in den Fällen, wo die hinzugefügte Menge KOH mehr oder weniger der anwesenden Glucosemenge äquivalent ist, muß wohl einer hydrolytischen Spaltung des Kaliumglucosats zugeschrieben werden. Die Hydrolyse ist bemerkbar, wenn nicht genug Überschuß entweder von KOH oder von Glucose in der Lösung anwesend ist.

Weiter muß bei verschiedenen Glucosekonzentrationen, die ich c_1 und c_2 (in Äquivalenten) nenne, bei einer Konzentration c (ebenfalls in Äquivalenten) an KOH, das k der Zuckerkonzentration umgekehrt proportional gefunden werden. Letzteres stimmt, kleine Abweichungen außer Betracht gelassen.

$$\begin{aligned} k' : k'' &= \operatorname{tg} \alpha_1 : \operatorname{tg} \alpha_2 \\ &= \frac{k_{max}}{c_1} : \frac{k_{max}}{c_2} \quad \text{oder} \\ k' : k'' &= c_2 : c_1. \end{aligned}$$

Es ist leicht einzusehen, daß man bei verschiedenen Glucosekonzentrationen c_1 und c_2 ein gleiches k würde finden müssen, wenn die Laugekonzentrationen c' und c'' so gewählt sind, daß $c' : c'' = c_1 : c_2$.

Die Auffassung, daß die Bildung und Unbeständigkeit von Kaliumglucosat Ursache der Umlagerungsreaktion ist, wird durch die Rotationserniedrigung der sich in Lösung befindenden Glucose bei Zusatz von Kaliumhydroxyd vollkommen gestützt. Den größten Wert für diese Erniedrigung, welche sofort eintritt, bekommt man, wenn anzunehmen ist, daß alle Glucose in die Monokaliumverbindung umgewandelt ist. Bei der Ver-

bindung zwischen $C_6H_{12}O_6$ und KOH wird der Ring aufgespalten und die offene Kette gebildet.

```
    CHOH                                      H
     |                                       /
 H—C—OH  |                                C—OH
     |        O                              | \ OH
HO—C—H  |                          H—C—OH
     |                                       |
 H—C                  + KOH  →    HO—C—H
     |                                       |
 H—C—OH                              H—C—OK
     |                                       |
    CH₂OH                             H—C—OH
                                             |
                                            CH₂OH
```

α- und β-Glucose. Offene Kette.

Letzte Struktur wird mit Aldehydeigenschaften verknüpft sein und nach der Deutung von A. Wohl und C. Neuberg[1]) Aldo- (und Keto-) Enol-Verschiebungen veranlassen, die dann zu der inaktiven Mischung der Monosen führen.

Ich beabsichtige, meine Auffassungen noch näher zu begründen. Zugleich werden die Untersuchungen nach anderen Richtungen fortgesetzt werden. Angenehm ist es mir, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. I. Waterman für seine geschätzte Teilnahme zu danken.

---

[1]) A. Wohl und C. Neuberg, Ber. **33**, 3099, Fußnote 2, 1900; vgl. auch J. U. Nef, Ann. **357**, 294 ff., 1907.

Die Metallisierung von Organismen.

Von

N. D. Zelinsky.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie an der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 24. November 1923.)

Auf das in dem vorliegenden Aufsatze beschriebene Phänomen stieß ich zufällig bei meinen Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung lebender Organismen.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß ein jedes lebende Individuum als ein bestimmtes komplexes System aufgefaßt werden kann, wollte ich die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Lebewesen bestimmen und miteinander vergleichen. Bei der Lösung dieser Aufgabe hatte ich vorwiegend mit diversen Organismen von kleinen Dimensionen und geringem Gewicht zu tun, da man bei der Untersuchung auf die üblichen Methoden der organischen Analyse angewiesen ist, bei denen man bekanntlich mit einigen Zehntel Grammen Substanz zu operieren hat.

Der lebende Organismus, ein aus mehreren Phasen bestehendes kompliziertes System, wurde bisher als solcher und ganzer noch nicht auf seine quantitative Zusammensetzung geprüft. Die Lösung dieser Frage scheint in mancher Hinsicht von Interesse zu sein, z. B. um feststellen zu können, ob die Substanz aller Organismen eine und dieselbe Zusammensetzung aufweist, oder ob dieselbe je nach den verschiedenen Tierarten gewissen Schwankungen unterworfen ist; ob die Zusammensetzung sich innerhalb einer und derselben Gattung ändert, ob sie konstant für eine und dieselbe Art ist oder in ungleichen Stadien der Entwicklung verschieden ausfällt.

Jeder lebende Organismus stellt eine gewisse Kombination von Zellelementen dar, welche scheinbar nichts anderes sind als chemische Verbindungen von komplexem Charakter mit einem großem Vorrat an Energie; einige Formen der Kohlenstoffverbindungen eines lebenden Organismus können sogar mit Sprengstoffen verglichen werden. Der harmonische Verlauf der chemischen Prozesse in diesen komplexen Gebilden bedingt begreiflicherweise nicht nur das Leben der einzelnen Zelle, sondern auch deren gemeinschaftliche Funktion im Zellenstaat, d. h. im Organismus.

Das Wasser ist ein notwendiges Medium im Organismus, in welchem sich fortwährend assoziierende, dissoziierende und elektrolytische Prozesse abspielen, die durch die Gegenwart von Wasser bedingt sind. Das Wasser muß demnach als ein wesentlicher Bestandteil des lebenden Körpers angesehen werden, weil nur bei Anwesenheit einer ausreichenden Menge die biochemischen Prozesse im Organismus vor sich gehen können. Demnach ist das Wasser in einem lebenden Organismus nicht von dessen organisch-mineralischen Anteilen zu trennen, es stellt einen integrierenden Bestandteil eines Organismus dar, so daß wir einen richtigen Begriff über die Zusammen-

setzung eines Lebewesens nur dann bekommen können, wenn wir dasselbe als ein Ganzes der Analyse unterwerfen.

Bisher haben Physiologen, Biologen und Chemiker ihre Hauptaufmerksamkeit auf die Ermittlung der Zusammensetzung einzelner Organe von Tier und Mensch in wasserfreiem, trockenem Zustande gerichtet. Die Entwässerung eines Organs oder eines Teils desselben erfordert besondere Vorsichtsmaßregeln, damit mit dem Wasser nicht etwa zugleich andere leichtflüchtige, stickstoff- und schwefelhaltige organische Bestandteile entweichen. Diese Maßregeln reichen allem Anschein nach nicht aus, da mit den Wasserdämpfen auch die vom Tiergewebe adsorbierten flüchtigen organischen Verbindungen entfernt werden können.

Bei der Ermittlung der Zusammensetzung eines Lebewesens können zwei Methoden zur Anwendung gelangen: man unterwirft das Individuum unmittelbar als ganzes der Analyse, oder man hydrolysiert dasselbe zuerst katalytisch mittels verdünnter Mineralsäure bei erhöhter Temperatur und untersucht dann das Hydrolysat, welches die einfachen chemischen Formen, aus denen das plastische Material des betreffenden Lebewesens aufgebaut war, repräsentiert, auf seine Zusammensetzung. Die erste Methode bleibt beschränkt auf die Organismen, deren Gewicht in den Grenzen von 0,1 bis etwa 1 g schwankt.

Bei meinen Untersuchungen bediente ich mich zunächst der ersten Methode und wandte meine Aufmerksamkeit zunächst den Bienen zu, deren geringes Gewicht und Volumen es gestatten, bei der Ermittlung des Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehaltes bequem einige Exemplare in einem längeren, genügend breiten Platinschiffchen auf einmal unterzubringen.

Von diesem Insekt aus die Untersuchungen einzuleiten, schien mir schon aus dem Grunde angebracht, da mein Kollege, der bekannte Zoologe *G. A. Koschewnikoff* sich bereitwillig erboten hatte, mir das Untersuchungsmaterial in Gestalt einzelner Individuen verschiedenen Alters und verschiedener Entwicklungsstadien zu liefern.

Ich glaubte ausführlicher auf die Aufgaben und Ziele der unternommenen Untersuchungen eingehen zu dürfen, da gerade diese Arbeiten mich nebenbei zur Metallisierung von Organismen geführt haben, ohne daß ich an die Möglichkeit einer solchen unter den gegebenen Versuchsbedingungen zuerst gedacht habe.

Ich komme nun zur Beschreibung der Arbeitsweise, nach welcher ich die Stickstoffbestimmung nach *Dumas* vornahm und die mich zur Entdeckung der Metallisierungserscheinung führte, sowie zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung veranlaßte. Zur Analyse brachte ich eine Biene in ein Platinschiffchen und bedeckte das Tierchen mit einem Überschuß von fein verriebenem Kupferoxyd. Das Schiffchen wurde dann in ein von beiden Seiten offenes, entsprechend gefülltes Verbrennungsrohr geschoben, darauf die Luft durch Kohlensäure verdrängt und die Verbrennung wie üblich ausgeführt.

Erwärmt man nun das Rohr nicht sofort zum Zwecke der Regeneration von Kupferoxyd für die nachfolgende Analyse im Sauerstoffstrom, so findet man im Platinschiffchen unter einer Schicht von

reduziertem bzw. unverändertem Kupferoxyd den betreffenden Organismus, die Biene vor, und zwar im metallisierten Zustande unter Beibehaltung der ursprünglichen Größe, Form und sämtlicher morphologischer Merkmale.

Die nähere Untersuchung solcher metallisierter Bienen hat ergeben, daß der ganze Organismus mit einer dünnen Lage von metallischem Kupfer bedeckt ist. Man hat die Empfindung, als ob man es mit einem Bienchen zu tun hat, welches auf das kunstvollste aus Kupfer oder Bronze verfertigt wurde. Beim Brechen einer solchen Biene bemerkt man, daß die organischen Bestandteile nicht gänzlich verbrannt sind, sondern daß unter der metallischen Decke eine unverbrannte, kohlige, koksähnliche Masse vorhanden ist. Man hat es hier in der Tat mit einer *Verkokung* des Organismus zu tun. Somit stellt die metallisierte Biene ein verkohltes Skelett dar, welches mit einem Metallüberzuge bedeckt ist unter Beibehaltung der ursprünglichen Form. Außer Kohlenstoff und geringen Mengen von Wasserstoff enthält die verkohlte Masse auch Stickstoff.

Eine Reihe von Versuchen, welche ich mit Bienen und anderen Insekten, Larven und Schmetterlingspüppchen ausgeführt habe, ergab in allen Fällen ein und dasselbe Bild: alle Organismen, mit Kupferoxyd im Kohlensäurestrom verbrannt, werden mit einer Metallschicht bedeckt und behalten hierbei genau die äußere Form und dasselbe Aussehen. Um ein richtiges quantitatives Ergebnis über den Gehalt des Organismus an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff zu erhalten, muß das metallisierte Objekt nach dem Verreiben mit Kupferoxyd (in einem Achatschälchen) einer nochmaligen Verbrennung unterworfen werden.

Der Prozentgehalt an den organischen Elementen wird demnach für Kohlenstoff und Wasserstoff sowie für Stickstoff mittels zwei hintereinander folgender Verbrennungen ermittelt. Auf die Frage, welche Mengen an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff in dem metallisierten Tierreste verbleiben, gibt die zweite Verbrennung Aufschluß.

Die Analyse ergab in 0,1154 g Substanz 0,1561 g CO_2 und 0,0180 g H_2O, in 0,0687 g Substanz 1,6 ccm Stickstoff (12°, 738 mm), d. h. C — 36,89 Proz., H — 1,74 Proz., N — 2,68 Proz. Die weiteren Bestimmungen zeigten, daß die metallisierte Biene im Durchschnitt 0,0123 g wiegt, während das Gewicht einer über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrockneten Biene 0,0171 g beträgt.

Der Aschengehalt, auf die Trockensubstanz der Biene berechnet, beträgt 7,09 Proz.; rechnet man diese Zahl auf das Gewicht des metallisierten Organismus um, so bekommen wir eine solche von fast 10 Proz. (9,85). Der organische Koksrest zusammen mit der Asche macht in dem metallisierten Organismus 51,16 Proz. aus (C — 36,89; H — 1,74; N — 2,68; Asche 9,85). Auf das Kupfer bleiben demnach fast 49 Proz. (48,84) übrig.

Daraus ersieht man, daß die Kupferschicht nicht sehr dünn ist und ihrer Masse nach einen wesentlichen Teil des metallisierten Objektes beträgt. Das Gewicht einer metallisierten Biene beträgt 71,9 Proz. des Tierchengewichtes in entwässertem Zustande.

Wie bereits erwähnt, behält der metallisierte Organismus sämtliche morphologischen Merkmale und Eigenschaften.

Auf dem metallisierten Insekt sind deutlich Kopf, Brust, Hinterleib, das Paar der Antennen und die Mundteile zu sehen. Sehr deutlich erkennt man die Brust, die aus drei Ringen besteht, drei Paar Beine und die an der Brust befestigten Flügel, alles bleibt im metallisierten Zustande erhalten. Die aus Chitinplättchen bestehenden Flügel mit ihrem System von Adern enthalten die detailliertesten morphologischen Merkmale. Wie bekannt, weisen bei Insekten die Antennen eine außerordentliche Mannigfaltigkeit auf, sie behalten im metallisierten Zustande die ihnen zukommende Struktur und erscheinen bald fadenförmig, bald wie Borsten oder Feilchen, bald stecknadelähnlich.

Die schlanke längliche Larve des Schwimmkäfers (Dytiscus) z. B. mit ihrem großen Kopf, kurzen Antennen und den charakteristischen sichelförmigen Kinnbacken, Augenhöhlen und Stirnbögen, mit drei Paaren gut entwickelter haariger Füße ist unter Wahrung all dieser morphologischen Eigentümlichkeiten der Insekten sehr fein mit Metall überzogen und macht den Eindruck eines aus Kupfer verfertigten Organismus.

Nicht nur größere Insekten, wie verschiedene ein oder einige Gramm wiegende Käferarten werden unter den angegebenen Bedingungen vorzüglich metallisiert, sondern auch ganz kleine Exemplare von Stecknadelknopfgröße geben so ein vorzügliches Bild der natürlichen Art wieder. Die Mäntel mancher Käfer sind sehr schön gezeichnet, auch diese Zeichnungen bleiben wie eingraviert im metallisierten Zustande erhalten. Die Metallisierung ist so vollkommen und gleichmäßig, daß es den Anschein hat, als ob der Organismus als negative Elektrode in einem galvanischen Bade seinen Metallüberzug erhalten habe.

Kann auch ein Pflanzengewebe unter den gleichen Bedingungen metallisiert werden? Um diese Frage zu beantworten, wählte ich absichtlich ein sehr zartes Pflanzenorgan, die federig behaarte Granne (Arista) der Deckspelze (Palaea inferior) von Stipa pennata L. Der Versuch zeigte, daß der feine Stengel und die Fädchen metallisiert waren unter Beibehaltung der Struktur. Somit ist die Frage zu bejahen; ich kann nur auf etwas größere Sprödigkeit der metallisierten pflanzlichen Faser gegenüber der tierischen hinweisen.

Wir haben es hier sozusagen mit einer *Pseudomorphose des Kupfers nach dem Organismus zu tun.* Eine solche Pseudomorphose hat nichts Gemeinsames mit dem Material, dessen Formen sie annimmt. Hier liegt keine Analogie z. B. mit dem Roteisenerz vor, welches in Pyritwürfeln kristallisiert, in welchem Falle wir es mit einer chemischen Pseudomorphose zu tun haben. Viel eher könnte man die Erscheinung mit einer mechanischen Pseudomorphose vergleichen, bei welcher zwischen der angenommenen Form und dem Material keine chemischen

Beziehungen existieren, wie im Falle von Quarzkristallen nach Kalkspath. Wir können deshalb sagen: Pseudomorphose des Kupfers (oder vielleicht eines anderen Metalles) nach der Biene, nach dem Schwimmkäfer, nach irgend einem anderen Insekt oder Organismus.

Worin besteht nun der Prozeß der Metallisierung, welche chemischen und mechanischen Kräfte sind hier im Spiele? Wahrscheinlich hat man es hier mit folgenden Erscheinungen zu tun: bei der hohen Temperatur von 400 bis 500° sublimiert das Kupferoxyd, dringt in die oberen Schichten des organischen Gewebes ein, mineralisiert dasselbe unter stufenweisem Ersatz der organischen Elemente, welche auf Kosten von Kupferoxydsauerstoff verbrennen, an deren Stelle das reduzierte metallische Kupfer hinterlassend.

Vielleicht haben wir es hier mit einer Erscheinung *der Adsorption* der festen Phase des Kupferoxyds an die feste Phase des organischen Tiergewebes zu tun, ähnlich wie es der Fall ist bei den interessanten Versuchen von *M. A. Iljinsky*, bei welchen die feste Phase einer Faser die in Wasser suspendierten wasserunlöslichen Pigmente mit großer Leichtigkeit zu adsorbieren vermag. Es ist vorläufig noch nicht möglich, eine vollwertige Erklärung der beschriebenen Metallisierungserscheinungen zu geben. Man kann nur sagen, daß der Metallisierungsvorgang bei Temperaturen, die über 250° liegen, vor sich gehen muß, da mittels Silberoxyd, welches bei dieser Temperatur vollständig dissoziiert, wie ich mich überzeugt habe, keine Metallisierung stattfindet. Die oben beschriebenen Erscheinungen verdienen meines Erachtens ein gewisses Interesse und Aufmerksamkeit. Ich beabsichtige daher, die Bedingungen aufzufinden, welche gestatten würden, Organismen von größeren Dimensionen als Insekten zu metallisieren. Im Prinzip liegt kein Grund vor, warum unter zweckmäßigen Bedingungen nicht etwa die Metallisierung eines größeren Tieres, ja einer Menschenleiche zu realisieren wäre.

Die metallisierten Insekten kann man mit den fossilen Insektenexemplaren vergleichen, welche in älteren und neueren geologischen Ablagerungen gefunden werden. Solche metallisierte Insektenabdrücke hat man bekanntlich vielfach in den Tertiärablagerungen gefunden. Aus erklärlichen Gründen weisen aber solche Funde einen weniger vollkommenen Habitus auf als die von mir metallisierten Organismen.

Das aufgefundene Verfahren verspricht, wie es scheint, in der wissenschaftlich-technischen Praxis zur Anwendung zu kommen. Es wird helfen, seltene bzw. aussterbende Tierarten (Insekten und andere) für die Zukunft, wenn nicht in ihrer ursprünglichen Gestalt, so doch in photographisch getreuen Kupferpseudomorphosen der betreffenden Organismen zu erhalten, die eine größere Haltbarkeit aufweisen werden als die ausgetrockneten Organismenformen unserer Sammlungen.

Untersuchungen über die Adsorption an hydrophile Kolloide.

Von

A. Lasnitzki und L. Farmer Loeb.

(Aus dem Universitätsinstitut für Krebsforschung, Berlin.)

(Eingegangen am 17. Januar 1924.)

Mit 16 Abbildungen im Text.

Adsorptionsvorgänge dürften im Organismus eine bedeutsame Rolle spielen. Als Adsorbentia kommen dabei in der Hauptsache hydrophile Kolloide in Betracht. Es sind verschiedene Beispiele bekannt, in denen nachgewiesen wurde, daß eine Adsorption an hydrophile Kolloide erfolgen kann. *Berczeller* (1) zeigte, daß die Oberflächenspannung des Wassers weniger erniedrigt wird, wenn Albumin oder Stärke in der Lösung vorhanden sind. *P. L. du Noüy* (2) fand ebenfalls, daß eine Adsorption oberflächenaktiver Substanzen an hydrophile Kolloide stattfindet. *L. Farmer Loeb* (3) konnte zeigen, daß die Micellen der Serumeiweißkörper Linol- und Ricinolsäuremoleküle adsorbieren. Genauere Untersuchungen *quantitativer* Art über die Adsorption an hydrophile Kolloide liegen aber bisher noch nicht vor.

Wie *H. Freundlich* (4) betont, „müßte man dazu die Micellen eines Sols, die einen anderen Stoff adsorbiert haben, durch Ultrafiltration von der intermicellaren Flüssigkeit trennen und den ursprünglichen Gesamtgehalt an Adsorptiv sowie dessen Menge in der abfiltrierten Flüssigkeit bestimmen". Wir haben es unternommen, eine Versuchsanordnung ausfindig zu machen, die obigen Forderungen genügt. Jedoch zeigte sich schon in Vorversuchen, daß eine nicht unbeträchtliche Adsorption der als Adsorbenda dienenden Stoffe — es handelte sich um oberflächenaktive Substanzen — an das Ultrafilter (Kollodiumfilter) stattfindet. Wir beschlossen daher, dieses Verfahren aufzugeben und als Maß der Adsorption die Erhöhung der Oberflächenspannung zu wählen, welche sich ergibt, wenn man der wässerigen Lösung eines kapillaraktiven Stoffes eine kolloide Substanz hinzufügt. Die Messung der Oberflächenspannung führten wir mit der Tropfpipette von *Rona* und *Michaelis* aus. Verglichen mit dem *Traube*schen Stalagmometer, bietet diese ja den Vorteil, daß sie größere Ausschläge gibt, wenngleich die beobachtete Tropfenzahl wegen der größeren Ausflußgeschwindigkeit der Oberflächenspannungsänderung nicht genau parallel geht. Bei Anwendung von Lösungen hydrophiler Kolloide tritt häufig noch die Zunahme der Viskosität störend dazwischen. Abgesehen davon, beträgt die Fehlerbreite der Methode mindestens $\pm$ 1 Tropfen, was einer nicht geringen Differenz der Oberflächenspannung entspricht. Es kommt hinzu, daß wegen der Möglichkeit einer gegenseitigen Verdrängung von Kolloid und kapillaraktiver Substanz die Änderung der Oberflächenspannung kein absolut sicheres Maß für die Größe der Adsorption darstellen kann. Aus diesen

Gründen wird die Methode nur als vorläufiger Notbehelf in Frage kommen können.

Zur Verwendung kamen zwei Tropfpipetten von 88 und 92 Tropfen Wasserwert. Jedoch sind die in den folgenden Tabellen angegebenen Tropfenzahlen relative, indem die Tropfenzahl des reinen Wassers bzw. der reinen kolloiden Lösung jeweiliger Konzentration gleich 100 gesetzt wurde.

Als Adsorbentien benutzten wir Sole von *Stärke* und *Gelatine* verschiedener Konzentration. Die Stärkelösungen wurden in der üblichen Weise durch Verkleistern von Aufschwemmungen „löslicher“ Stärke und darauffolgendem 5 Minuten langem Kochen erhalten, während die Gelatinelösungen aus isoelektrischer Gelatine hergestellt wurden, die wir nach dem Verfahren von *Jacques Loeb* (5) aus gewöhnlicher Gelatine bereiteten. Die als Adsorbenda dienenden oberflächenaktiven Stoffe waren *Buttersäure* und *Isovaleriansäure*.

Daß die Wiedererhöhung der Oberflächenspannung bei gleichzeitiger Anwesenheit eines hydrophilen Kolloids in der Tat auf einer Adsorption des kapillaraktiven Stoffes an das Kolloid beruht, geht nun mit großer Wahrscheinlichkeit daraus hervor, daß man bei sukzessiver Verdünnung der rein-wässerigen und kolloidhaltigen Lösungen einen Ausgleich in dem Unterschiede der Tropfenzahlen erhält, was einem Rückgang der Adsorption entsprechen müßte (Tabelle I). Dies stimmt mit unseren geläufigen Vorstellungen überein.

Tabelle I.

Verdünnung	Buttersäure (0,2916 Mol/Liter) a) in wässeriger Lösung; b) in 5 proz. Stärkelösung. Wasserwert: 88				Buttersäure (0,2916 Mol/Liter) a) in wässeriger Lösung; b) in 0,5 proz. Gelatinelösung. Wasserwert: 92			
	Tropfenzahl				Tropfenzahl			
	Reine 5proz. Stärkelösung	a) Buttersäure in wässeriger Lösung (Wasser = 100)	b) Buttersäure in 5proz. Stärkelösung (Reine Stärkelösung = 100)	Differenz von a) und b)	Reine 0,5 proz. Gelatinelösung	a) Buttersäure in wässeriger Lösung (Wasser = 100)	b) Buttersäure in 0,5 proz. Gelatinelösung (Reine Gelatinelösung = 100)	Differenz von a) und b)
—	88	167	152	15	100	165	132	33
1 : 2	91	142	133	9	100	140	119	21
1 : 4	90	124	122	2	99	124	111	13
1 : 8	89	112,5	112	0,5	98	115	106	9

Bei der quantitativen Verfolgung der Erscheinung interessierte namentlich die Frage, ob sich hier die von *Freundlich* für grobdisperse Systeme gefundene Gesetzmäßigkeit wiederfinden läßt. Wir gingen so vor, daß wir uns Butter- und Isovaleriansäurelösungen in ungefähr geometrisch ansteigender Konzentration herstellten, einmal mit, einmal ohne Zusatz obiger Kolloide. Mit diesen Lösungen wurden die Tropfversuche angestellt und der Gehalt an Butter- bzw. Isovaleriansäure durch Titration mittels n/50 NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator bestimmt, wobei der dem Gelatine- oder Stärkegehalt entsprechende Säurewert in Abzug kam[1]). So gelangten wir einerseits zu Eichkurven von Butter- und Isovaleriansäure,

[1]) Die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes erfolgt offenbar mit großer Geschwindigkeit, da man schon unmittelbar nach Herstellen der Mischungen konstante Tropfenzahlen erhält.

andererseits, für die Versuche mit Kolloiden, zu Kurven von abweichendem Verlauf. Die den einzelnen Punkten der letzteren entsprechenden Gleichgewichtskonzentrationen konnten aus der zugehörigen Eichkurve abgelesen werden. Die Differenz gegenüber der Gesamtkonzentration lieferte die adsorbierte Menge. Die Versuche wurden zunächst bei Zimmertemperatur, später auch bei tieferer und höherer Temperatur ausgeführt.

A. Versuche bei Zimmertemperatur.

Die Temperatur schwankte während der ganzen Dauer der Versuche nur zwischen 19 und 21°, kann also mit hinreichender Genauigkeit als konstant betrachtet werden. Wir stellten zunächst Versuchsreihen an mit konstanter Konzentration des zugesetzten Kolloids und variabler Konzentration des oberflächenaktiven Stoffes. In wässeriger Lösung ergaben sich für verschiedene Konzentrationen von Butter- und Isovaleriansäure die folgenden Tropfenzahlen:

Tabelle II.

Buttersäure und Isovaleriansäure in wässeriger Lösung bei Zimmertemperatur.

Nr.	a) Buttersäure Wasserwert = 92		Nr.	b) Isovaleriansäure Wasserwert = 88	
	Konzentration (Mol/Liter)	Tropfenzahl (Wasser = 100)		Konzentration (Mol/Liter)	Tropfenzahl (Wasser = 100)
1	0,0296	113	1	0,0104	117
2	0,0562	125	2	0,0150	120
3	0,0724	129	3	0,0202	128
4	0,1166	143	4	0,0272	134
5	0,1556	150	5	0,0408	147
6	0,2322	166	6	0,0544	157
7	0,3100	176	7	0,0820	173

Diese Werte sind den Eichkurven in Abb. 1, 3, 5, 7 zugrundegelegt. Die Versuche mit Zusatz von Stärke und Gelatine zu Buttersäurelösungen einerseits, Isovaleriansäurelösungen andererseits führten zu Resultaten, von denen ein Teil in den Tabellen III bis VI wiedergegeben ist. Bei der graphischen Darstellung ergaben sich Kurven, die unterhalb der zugehörigen Eichkurve zu liegen kommen (Abb. 1, 3, 5, 7). Ihre Entfernung von der Eichkurve und dementsprechend die Größe der Adsorption wächst mit der Konzentration des Kolloids. Schwächere Konzentrationen des letzteren erweisen sich von relativ größerem Einfluß als stärkere. Mit steigender Konzentration des Kolloids scheint die Adsorption einem Grenzwert zuzustreben. Endlich ist die Adsorption durch Gelatine im ganzen stärker als die durch Stärke, namentlich im Verhältnis zur angewandten Konzentration.

Liest man nun für jeden gefundenen Punkt der Stärke- und Gelatinekurven aus der zugehörigen Eichkurve die Gleichgewichtskonzentration ab — d. i. die Konzentration bei gleich großer Tropfenzahl —, so findet man durch Subtraktion von der Gesamtkonzentration die adsorbierte Menge. Dieselbe ist in Millimol pro Liter angegeben. Logarithmiert man die Werte für die Gleichgewichtskonzentration und

Adsorption, so erhält man bei der graphischen Darstellung eine Anzahl Punkte, die einen geradlinigen Verlauf mit relativ geringer Streuung erkennen lassen (Abb. 2, 4, 6, 8). Damit ist der Nachweis erbracht, daß *die Adsorption an die hier in Frage kommenden hydrophilen Kolloide tatsächlich nach dem Freundlichschen Adsorptionsgesetz* — $a = \alpha . c^{1/n}$ — verläuft.

Tabelle III.

Versuche mit Buttersäure in Stärkelösungen verschiedener Konzentration (Wasserwert: 92).

Stärkekonzentration (Gew.-Proz.)	Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärkelösung = 100)	Gesamtkonzentration der Buttersäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	log c	log a
1 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 95.)	1	119	0,0758	0,044	31,8	— 1,36	1,50
	2	125	0,1034	0,058	45,4	— 1,24	1,66
	3	132	0,1442	0,079	65,2	— 1,10	1,81
	4	143	0,2110	0,116	95,0	— 0,94	1,98
	5	154	0,2904	0,164	126,4	— 0,79	2,10
2,5 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 94.)	1	120	0,0764	0,045	31,4	— 1,35	1,50
	2	123	0,0902	0,054	36,2	— 1,27	1,56
	3	134	0,1488	0,085	63,8	— 1,07	1,80
	4	138	0,1782	0,098	80,2	— 1,01	1,90
	5	154	0,2910	0,164	127,0	— 0,79	2,10
5 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 92.)	1	112	0,0534	0,027	26,4	— 1,57	1,42
	2	118	0,0844	0,040	44,4	— 1,40	1,65
	3	123	0,1090	0,053	56,0	— 1,28	1,75
	4	133	0,1762	0,082	94,2	— 1,09	1,97
	5	141	0,2266	0,110	116,6	— 0,96	2,07

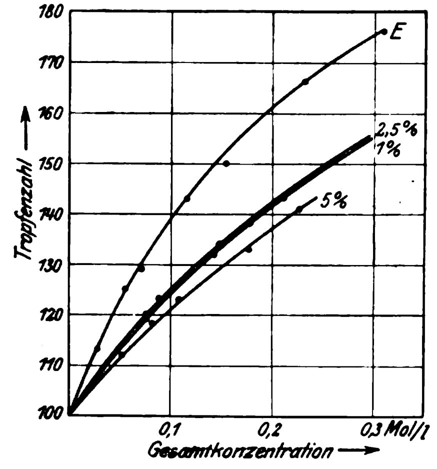


Abb. 1. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Buttersäure in 1-, 2,5- und 5proz. Stärkelösung. E = Eichkurve.

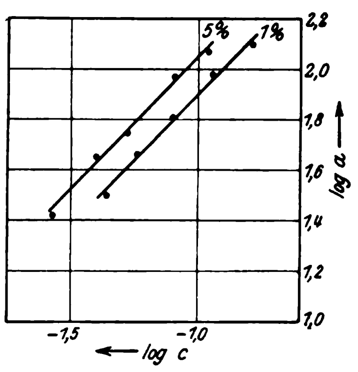


Abb. 2. Adsorptionsisothermen von Buttersäure an 1- und 5proz. Stärke im logarithmischen Netz. Die Isotherme für die 2,5proz Stärkelösung deckt sich fast völlig mit der für die 1proz.

Tabelle IV.

Versuche mit Buttersäure in Gelatinelösungen verschiedener Konzentration (Wasserwert: 92).

Gelatinekonzentration (Gew.-Proz.)	Nr.	Tropfenzahl (Reine Gelatinelösung = 100)	Gesamtkonzentration der Buttersäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	log c	log a
0,1 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 102.)	1	113	0,0752	0,030	45,2	— 1,52	1,66
	2	117	0,0948	0,038	56,8	— 1,42	1,75
	3	126	0,1474	0,061	86,4	— 1,21	1,94
	4	133	0,1910	0,082	109,0	— 1,09	2,04
	5	148	0,2956	0,136	159,6	— 0,87	2,20
0,5 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 102.)	1	108	0,0704	0,019	51,4	— 1,72	1,71
	2	112	0,0964	0,027	69,4	— 1,57	1,84
	3	119	0,1400	0,043	97,0	— 1,37	1,99
	4	125	0,1850	0,058	127,0	— 1,24	2,10
	5	136	0,2832	0,092	191,2	— 1,04	2,28
1,0 Proz. (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 102.)	1	108	0,0744	0,019	55,4	— 1,72	1,74
	2	111	0,0964	0,025	71,4	— 1,60	1,85
	3	119	0,1478	0,043	104,8	— 1,37	2,02
	4	125	0,1954	0,058	137,4	— 1,24	2,14
	5	134	0,2916	0,085	206,6	— 1,07	2,32

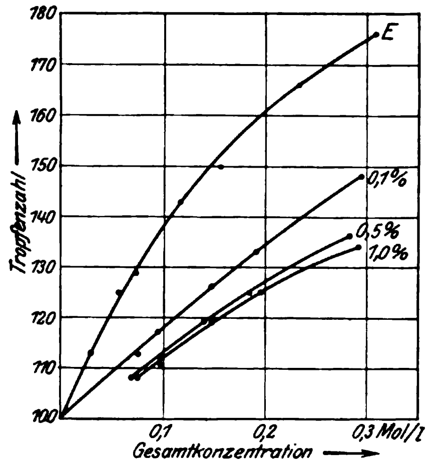


Abb. 3. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Buttersäure in 0,1-, 0,5- und 1,0 proz. Gelatinelösung. E = Eichkurve.

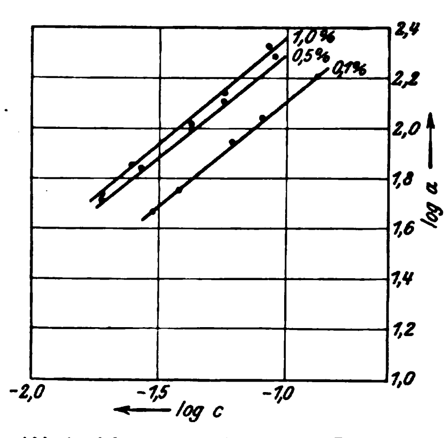


Abb. 4. Adsorptionsisothermen von Buttersäure in 0,1-, 0,5- und 1,0 proz. Gelatine im logarithmischen Netz.

Tabelle V.

Versuche mit Isovaleriansäure in Stärkelösungen verschiedener Konzentration (Wasserwert: 88).

Stärke-konzentration (Gew.-Proz.)	Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärkelösung = 100)	Gesamtkonzentration d. Isovaleriansäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	log c	log a
1 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 90.)	1	126	0,0224	0,0185	3,9	— 1,73	0,59
	2	131	0,0278	0,0230	4,8	— 1,64	0,68
	3	144	0,0434	0,0367	6,6	— 1,44	0,82
	4	153	0,0556	0,0479	7,7	— 1,32	0,89
	5	171	0,0914	0,0781	13,3	— 1,11	1,12
2,5 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 91.)	1	124	0,0234	0,0170	6,4	— 1,77	0,81
	2	129	0,0296	0,0210	8,6	— 1,68	0,93
	3	138	0,0414	0,0299	11,5	— 1,52	1,06
	4	146	0,0540	0,0391	14,9	— 1,41	1,17
	5	163	0,0840	0,0631	20,9	— 1,20	1,32
5 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 88.)	1	120	0,0200	0,0138	6,2	— 1,86	0,79
	2	125	0,0264	0,0177	8,7	— 1,75	0,94
	3	136	0,0400	0,0280	13,4	— 1,55	1,08
	4	144	0,0518	0,0366	15,2	— 1,44	1,18
	5	160	0,0800	0,0588	21,6	— 1,23	1,33

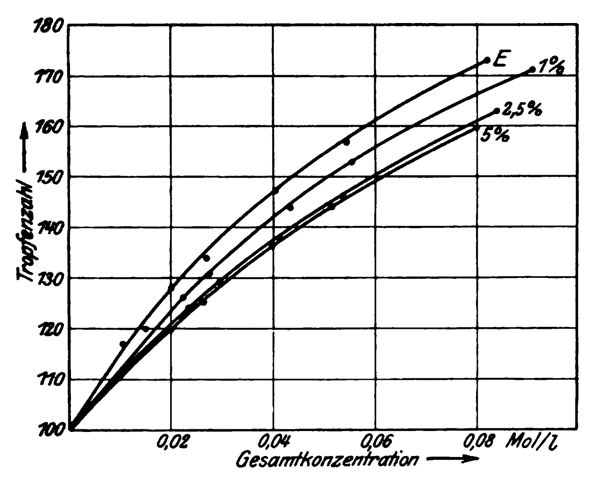


Abb. 5. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Isovaleriansäure in 1-, 2,5- und 5proz. Stärkelösung. E = Eichkurve.

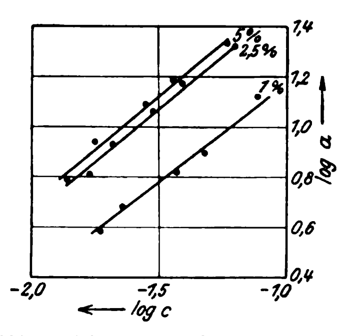


Abb. 6. Adsorptionsisothermen von Isovaleriansäure an 1-, 2,5- und 5proz. Stärke im logarithmischen Netz.

Tabelle VI.
Versuche mit Isovaleriansäure in Gelatinelösungen verschiedener Konzentration (Wasserwert: 88).

Gelatinekonzentration (Gew.-Proz.)	Nr.	Tropfenzahl (Reine Gelatinelösung = 100)	Gesamtkonzentration d. Isovaleriansäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	log c	log a
0,1 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 95.)	1	117	0,0194	0,0118	7,6	— 1,93	0,88
	2	122	0,0252	0,0157	9,5	— 1,80	0,98
	3	134	0,0406	0,0260	14,6	— 1,59	1,16
	4	142	0,0522	0,0345	17,7	— 1,46	1,25
	5	159	0,0802	0,0565	23,7	— 1,25	1,37
0,5 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 98.)	1	114	0,0204	0,0096	10,8	— 2,02	1,03
	2	118	0,0264	0,0125	13,9	— 1,90	1,14
	3	128	0,0408	0,0200	20,8	— 1,70	1,32
	4	135	0,0540	0,0270	27,0	— 1,57	1,43
	5	149	0,0804	0,0427	37,7	— 1,37	1,58
1,0 Proz. (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 95.)	1	113	0,0194	0,0089	10,5	— 2,05	1,02
	2	119	0,0282	0,0132	15,0	— 1,88	1,18
	3	126	0,0404	0,0188	21,6	— 1,73	1,33
	4	132	0,0516	0,0240	27,6	— 1,62	1,44
	5	146	0,0816	0,0393	42,3	— 1,41	1,63

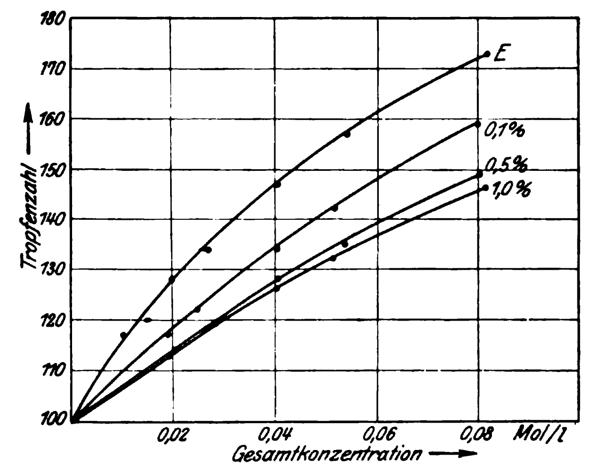


Abb. 7. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Isovaleriansäure in 0,1-, 0,5- und 1,0proz. Gelatinelösung. E = Eichkurve.

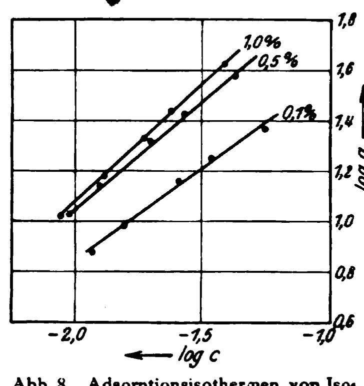


Abb. 8. Adsorptionsisothermen von Isovaleriansäure an 0,1-, 0,5- und 1,0 proz. Gelatine im logarithmischen Netz.

Wir ersahen aus Abb. 1, 3, 5, 7, daß die Adsorption bei kleinen Konzentrationen von Stärke und Gelatine relativ größer ist als bei stärkeren. Denselben Befund erhielten wir in Versuchen, in denen wir die Konzentration des oberflächenaktiven Stoffes konstant hielten und die Konzentration des zugesetzten Kolloids variierten. Es ergaben sich Kurven, die einen zunächst steileren, allmählich aber flacher werdenden Verlauf zeigen (Abb. 9, 10). Sehr deutlich ist dies namentlich in den Versuchen mit Gelatine, während die Stärkekurven zunächst ziemlich geradlinig nach abwärts

verlaufen und erst für größere Konzentrationen horizontal umbiegen. Es wäre zunächst die Frage zu entscheiden, inwieweit Fehlerquellen der Methodik für dieses eigentümliche Verhalten verantwortlich zu machen sind. Sollte sich das Resultat jedoch bei Anwendung genauerer Methoden bestätigen, so würde dies darauf hinweisen, daß die innere Oberfläche eines hydrophilen Kolloids mit steigender Konzentration — infolge Aggregation der Micellen — einem Grenzwert zustrebt.

Tabelle VII.

a) Variable Stärkekonzentration und konstante Isovaleriansäurekonzentration (0,057 Mol/Liter)			b) Variable Gelatinekonzentration und konstante Buttersäurekonzentration (0,181 Mol/Liter)		
Stärkekonzentration (Gew.-Proz.)	Tropfenzahl		Gelatinekonzentration (Gew.-Proz.)	Tropfenzahl	
	Wässerige Lösung (Wasser = 88)	Isovaleriansäurehaltige Lösung (Wässerige Lösung = 100)		Wässerige Lösung (Wasser = 92)	Buttersäurehaltige Lösung (Wässerige Lösung = 100)
0	88	159	0	92	152
0,5	89	156	0,025	98	142
1,0	90	153	0,05	100	139
2,0	91	148	0,1	101	136
3,0	91	144	0,2	101	132
4,0	90	142	0,3	102	128
5,0	88	142	0,5	102	125
			0,7	102	124
			1,0	102	123

Infolge dieser Verhältnisse wird die Größe der Adsorption bei Zurückführung der adsorbierten Menge auf die Gewichtseinheit Adsorbens für jede angewandte Konzentration desselben verschieden sein und die Konstanten α und $1/n$ daher keine einheitlichen Werte annehmen. Wir haben auf eine Ermittlung sämtlicher Konstanten einstweilen verzichtet. Nur die für eine 0,1 proz. Gelatinelösung seien hier angegeben, weil bei dieser die Gewichtseinheit Adsorbens im Liter enthalten ist und die gefundenen Zahlen daher unmittelbar benutzt werden können. Es ergibt sich:

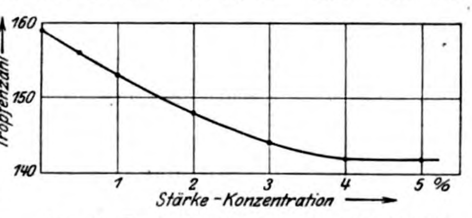


Abb. 9. Graphische Darstellung zu Tabelle VIIa.

Adsorbendum	α	$1/n$
Buttersäure . . .	877	0,84
Isovaleriansäure .	202	0,73

Erwähnt sei noch, daß der Größenordnung nach die Adsorption an 0,1 proz. Gelatine etwa der an 5 proz. Stärke gleichkommt.

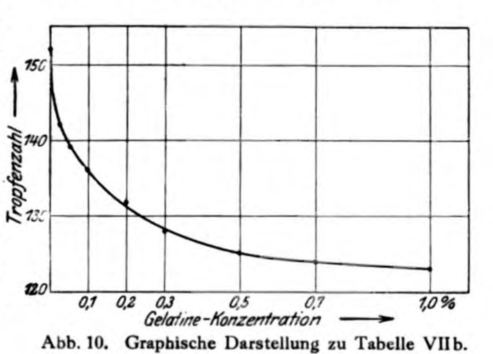


Abb. 10. Graphische Darstellung zu Tabelle VIIb.

B. Versuche bei 0 und· *36°.*

Um der Frage näher zu treten, welchen Einfluß die Temperatur auf die Adsorption an hydrophile Kolloide ausübt, stellten wir einige orientierende Versuche an, die der Vollständigkeit wegen hier mitgeteilt werden sollen. Es wurden Versuchsreihen bei zwei verschiedenen Temperaturen angesetzt, indem die Lösungen — mit und ohne Zusatz von Kolloiden — einmal im Wasserbade auf 36° erwärmt und einmal mit Eis auf 0° abgekühlt wurden. Während des Tropfversuchs war die Pipette, um Temperaturverluste möglichst zu vermeiden, in einem auf 36° gehaltenen Wärmekasten bzw. in einem mit Eiswasser gekühlten Glasbehälter untergebracht. Bei letzterer Versuchsanordnung war allerdings eine Wiedererwärmung um 3 bis 4° nicht zu verhindern. Wie Tabelle IX und Abb. 11, 12 dartun, gelangt man in den bei 0° mit Kolloiden ausgeführten Versuchen zu Punkten, die völlig im Bereich der zugehörigen Eichkurve liegen oder, wie bei der Adsorption von Buttersäure an Gelatine, nur wenig von ihr entfernt sind. Die Adsorption wäre demnach bei 0° aufgehoben oder mindestens stark herabgesetzt. Dieses Ergebnis ist um so bemerkenswerter, als bisherige in dieser Richtung ausgeführte Untersuchungen im allgemeinen nur eine mäßige Abhängigkeit der Adsorption von der Temperatur ergeben haben. Bei 36° läßt sich, wie Tabelle X, XI und Abb. 13, 15 zeigen, eine deutliche Adsorption nachweisen, die ebenfalls dem Adsorptionsgesetz gehorcht (Abb. 14, 16). Merkwürdigerweise ist die Adsorption der Buttersäure geringer als bei Zimmertemperatur. Doch ist dieses Resultat wegen der Unsicherheit der Methodik mit Vorsicht zu beurteilen.

Tabelle VIII.

Buttersäure und Isovaleriansäure in wässeriger Lösung bei 0 und 36° C. (Vgl. Eichkurven in Abb. 11, 12, 13, 15.)

Temperatur	Nr.	a) Buttersäure		Nr.	b) Isovaleriansäure	
		Konzentration (Mol/Liter)	Tropfenzahl (Wasser = 100)		Konzentration (Mol/Liter)	Tropfenzahl (Wasser = 100)
0°	1	0,0442	109	1	0,0138	111
	2	0,0536	111	2	0,0160	113
	3	0,0796	116	3	0,0234	118
	4	0,0992	119	4	0,0328	126
	5	0,1432	129	5	0,0440	134
	6	0,1874	134	6	0,0578	142
	7	0,2926	149	7	0,0846	156
		(Wasserwert = 94.)				
36°	1	0,0424	112	1	0,0118	113
	2	0,0776	117	2	0,0152	117
	3	0,1048	126	3	0,0228	128
	4	0,1506	137	4	0,0278	134
	5	0,1978	147	5	0,0428	149
	6	0,2880	165	6	0,0542	159
				7	0,0848	180
		(Wasserwert = 96.)				

Tabelle IX.

Versuche mit Buttersäure und Isovaleriansäure in 5proz. Stärke- und 0,5proz. Gelatinelösung bei 0°.

Kolloid	a) Buttersäure Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärke- u. Gelatinelösung = 100)	Gesamtkonzentration der Buttersäure (Mol/Liter)	b) Isovaleriansäure Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärke- u. Gelatinelösung = 100)	Gesamtkonzentration d. Isovaleriansäure (Mol/Liter)
5 proz. Stärkelösung (Tropfenzahl ohne Säuren = 88.)	1	110	0,0414	1	119	0,0222
	2	117	0,0812	2	124	0,0276
	3	120	0,0972	3	133	0,0418
	4	130	0,1460	4	140	0,0544
	5	135	0,1992	5	152	0,0814
	6	147	0,2770			
0,5 proz. Gelatinelösung (Tropfenzahl ohne Säuren = 91).	1	110	0,0508	1	117	0,0178
	2	114	0,0794	2	124	0,0316
	3	118	0,1000	3	129	0,0380
	4	127	0,1504	4	138	0,0506
	5	131	0,1950	5	145	0,0664
	6	140	0,2764	6	159	0,0940

Tabelle X.

Versuche mit Buttersäure in 5proz. Stärke- und 0,5proz. Gelatinelösung bei 36°.

Kolloid	Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärke- und Gelatinelösg. = 100)	Gesamtkonzentration der Buttersäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	$\log c$	$\log a$
5 proz. Stärkelösung (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 98.)	1	115	0,0838	0,064	19,8	— 1,19	1,30
	2	120	0,1100	0,084	26,0	— 1,08	1,41
	3	128	0,1592	0,115	44,2	— 0,94	1,65
	4	136	0,2090	0,149	60,0	— 0,83	1,78
	5	149	0,2956	0,206	89,6	— 0,69	1,95
0,5 proz. Gelatinelösung (Tropfenzahl ohne Buttersäure = 109.)	1	112	0,0852	0,052	33,2	— 1,28	1,52
	2	115	0,1052	0,064	41,2	— 1,19	1,61
	3	122	0,1594	0,091	68,4	— 1,04	1,84
	4	128	0,1988	0,115	83,8	— 0,94	1,92
	5	140	0,2924	0,165	127,4	— 0,78	2,11

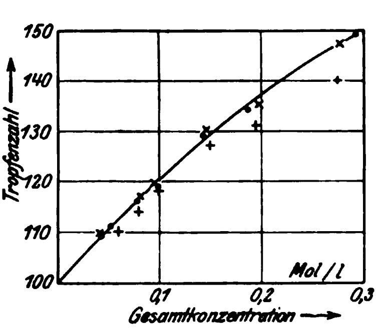


Abb. 11. Graphische Darstellung zu Tabelle IXa. (Versuche mit Buttersäure bei 0°.) Eichkurve ausgezogen. × Punkte der Stärkekurve. + Punkte der Gelatinekurve.

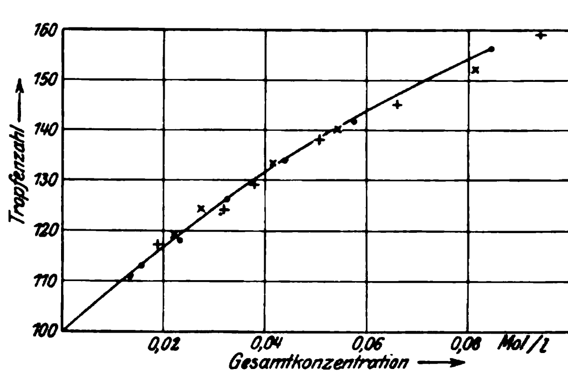


Abb. 12. Graphische Darstellung zu Tabelle IXb. (Versuche mit Isovaleriansäure bei 0°.) Eichkurve ausgezogen. × Punkte der Stärkekurve. + Punkte der Gelatinekurve.

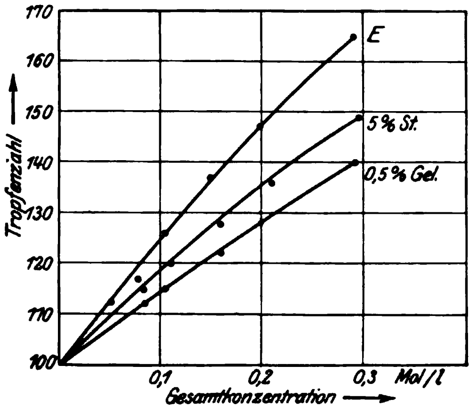


Abb. 13. Zu Tabelle X. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Buttersäure bei 36°. E = Eichkurve.

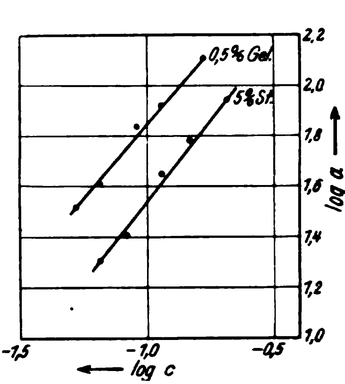


Abb. 14. Zu Tabelle X. Adsorptionsisothermen von Buttersäure an 5proz. Stärke und 0,5proz. Gelatine bei 36° im logarithmischen Netz.

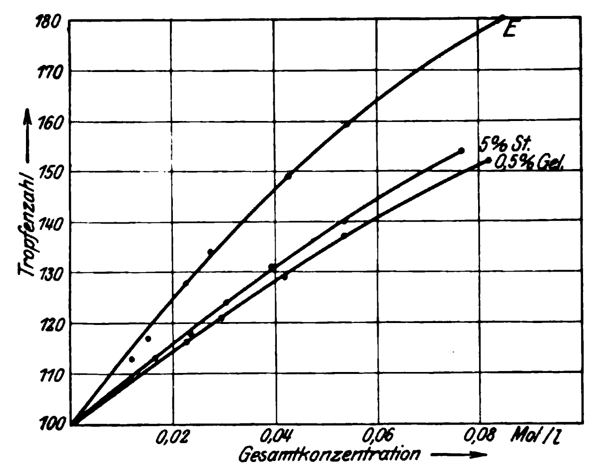


Abb. 15. Zu Tabelle XI. Graphische Darstellung der Tropfversuche mit Isovaleriansäure bei 36°. E = Eichkurve.

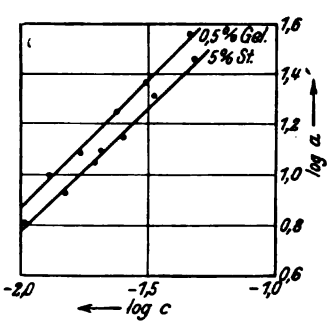


Abb. 16. Zu Tabelle XI. Adsorptionsisothermen von Isovaleriansäure an 5proz. Stärke und 0,5proz. Gelatine bei 36° im logarithmischen Netz.

Tabelle XI.
Versuche mit Isovaleriansäure
in 5proz. Stärke- und 0,5proz. Gelatinelösung bei 36°.

Kolloid	Nr.	Tropfenzahl (Reine Stärke- und Gelatine-lösg. = 100)	Gesamtkonzentration d. Isovaleriansäure (Mol/Liter)	Gleichgewichtskonzentration c (Mol/Liter)	Adsorbierte Menge a (Millimol/Liter)	log c	log a
5 proz. Stärkelösung (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 97.)	1	113	0,0166	0,0103	6,3	— 1,99	0,80
	2	118	0,0234	0,0149	8,5	— 1,83	0,93
	3	124	0,0308	0,0197	11,1	— 1,71	1,05
	4	131	0,0394	0,0254	14,0	— 1,60	1,15
	5	140	0,0538	0,0336	20,2	— 1,47	1,31
	6	154	0,0764	0,0478	28,6	— 1,32	1,46
0,5 proz. Gelatinelösung (Tropfenzahl ohne Isovaleriansäure = 108.)	1	116	0,0228	0,0130	9,8	— 1,89	0,99
	2	121	0,0294	0,0171	12,3	— 1,77	1,09
	3	129	0,0418	0,0239	17,9	— 1,62	1,25
	4	137	0,0536	0,0309	22,7	— 1,51	1,36
	5	152	0,0820	0,0457	36,3	— 1,34	1,56

Zusammenfassung.

1. Es wird der Versuch gemacht, die Adsorption an hydrophile Kolloide quantitativ zu verfolgen.

2. Als Adsorbentien dienen Sole von Stärke und Gelatine, als Adsorbenda zwei kapillaraktive Säuren, Buttersäure und Isovaleriansäure.

3. Der Rückgang der Oberflächenspannungserniedrigung nach Zusatz von Kolloiden gilt als Maß der Adsorption. Die Messung der Oberflächenspannung erfolgt mittels der Tropfmethode von *Rona* und *Michaelis*.

4. Bei Zimmertemperatur und bei 36° ergibt sich ein Verhalten, das dem *Freundlich*schen Adsorptionsgesetz genügt.

5. Mit steigender Konzentration des Adsorbens scheint sich die Adsorption einem Grenzwert zu nähern.

6. Bei 0° scheint die Adsorption stark herabgesetzt oder völlig aufgehoben zu sein.

Herrn Prof. *H. Freundlich*, Berlin-Dahlem, sind wir für wertvolle Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Literatur.

1) *L. Berczeller*, diese Zeitschr. **66**, 207, 1914. — 2) *P. L. du Noüy*, Journ. exper. med. **36**, 115, 1922. — 3) *L. Farmer Loeb*, diese Zeitschr. **136**, 190, 1923. — 4) *H. Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl., S. 739, 1922. — 5) *Jac. Loeb*, Journ. Amer. chem. soc. **44**, 213, 1922.

Über die Ursache der rapiden Katalaseverarmung von Blutlösungen.

Von

O. Steppuhn und **A. Timofejewa.**

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des staatlichen chemo-pharmazeutischen Forschungsinstitutes zu Moskau.)

(Eingegangen am 19. Januar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Läßt man eine verdünnte Blutlösung bei Zimmertemperatur oder besser im Thermostaten stehen, so beobachtet man eine rapide Verarmung dieser Lösung an Katalase oder genauer — der Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu zerlegen. Dieses tritt ein, ob man Vollblut oder defibriniertes Blut nimmt.

Wie wir bereits an anderer Stelle[1]) hervorhoben, verläuft der Prozeß mit der größten Geschwindigkeit in den ersten 30 Minuten, dann immer langsamer, um nach etwa 2 Stunden ein ziemlich konstantes Niveau zu erreichen. Diese Verhältnisse werden durch die Abb. 1 illustriert. Abb. 2 zeigt den Grad des Katalaseschwundes in Abhängigkeit von der Verdünnung des Blutes.

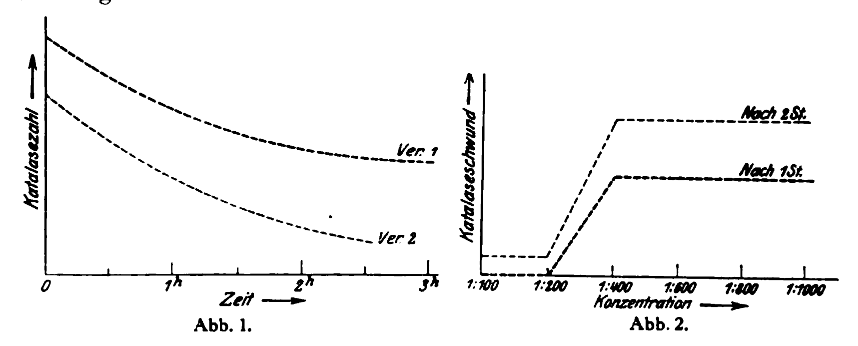


Abb. 1. Abb. 2.

Wir werden im weiteren Gelegenheit haben, auf die Interpretation der Abb. 2 noch zurückzukommen.

Batelli und *Stern*[2]) haben bereits beobachtet, daß Organextrakte zerstörend auf Katalase einwirken, und dieses mit der Existenz einer „Antikatalase" erklärt; es mag diese Erscheinung mit der oben beschriebenen in irgend einem Zusammenhange stehen. Neuerdings haben *A. Bach* und *Zubkowa*[3]) dem bei Blutlösungen erhobenen Befunde eine andere Erklärung gegeben und praktisch zu verwerten versucht.

---

[1]) *O. Steppuhn* und *A. Timofejewa*, diese Zeitschr. **136**, 213.

[2]) *Batelli* und *Stern*, C. r. Soc. Biol. 58, 235, 1905.

[3]) *Bach* und *Zubkowa*, diese Zeitschr. **125**, 283.

Auf den Beobachtungen von *Wäntig* und *Steche*[1]) fußend, daß gereinigte Katalase durch Trypsin zerstört wird und in Übereinstimmung mit einigen Befunden, daß reine Fettkatalase deutliche Eiweißreaktionen zeigt, glauben genannte Autoren, daß es die Protease der Blutlösung ist, welche entweder die Katalase selbst oder das auf Eiweiß als Schutzkolloid adsorbierte Ferment angreift. Dafür soll auch die Tatsache sprechen, daß die Katalase bei niedrigerer Temperatur (17°) besser arbeitet als bei höherer (37°), daß, mit anderen Worten, die Protease bei 37° rascher die Katalase zerstört als bei 17°.

Dieses führt *A. Bach* und *Zubkowa* (s. oben) zu einer Methode der Proteasebestimmung im Blute: je mehr Protease, desto stärker wird die Katalase bei Temperaturerhöhung zerstört. Die Bestimmung wird mit Lackblut 1 : 1000 ausgeführt. Was die Einzelheiten der Bestimmungsmethode anbetrifft, so wollen wir hier nicht darauf eingehen, es sei auf das Original verwiesen —, jedenfalls ist sie einfach, rasch ausführbar und manipuliert mit den geringsten Blutmengen. Allerdings wird man bei wissenschaftlichen Arbeiten wohl kaum Gelegenheit finden, sich für die Gesamtproteasen des Blutes und in einem so wenig „physiologischen“ Zustande, wie eine 1 : 1000-Lösung im destillierten Wasser, zu interessieren; denn Serum ist im gewissen Sinne Abwasser und Träger der ausgeschwemmten Proteasen, die Zellelemente des Blutes ganz allgemein ein Gewebe und Träger der Organprotease, das Lackblut also ein Gemisch dieser beiden Fermentgruppen mit ganz verschiedenen Aufgaben und Funktionen. Dagegen könnte bei gewissen pathologischen Zuständen eine so ausgesprochene Verschiebung der Gesamtprotease einer Blutlösung beobachtet werden, daß eine entsprechende abnorme „Zahl“ diagnostische Bedeutung gewinnen könnte. Das alles, wenn die Katalaseverarmung von Blutlösungen irgendwie mit der Aktion von Protease zusammenhängen würde.

Von rein theoretischem Standpunkte muß bemerkt werden, daß die Bedingungen der Versuche von *Wäntig* und *Steche* ganz andere sind wie diejenigen in verdünntem Blute. Vor allen Dingen ist das Antitrypsin nicht aus dem Wege zu räumen: es ist bekannt, wie aktiv es im Blutserum ist und wie mächtig es auch die Blutkörperchenproteolyse (Autolyse) hemmt, wenn Gesamtblut autolysiert wird. Es ist eben das Antitrypsin nicht nur gegen Pankreasprotease, sondern auch gegen Leucoprotease und Organproteasen[2]) tätig — somit gegen alle Blutproteasen, dagegen, wie es scheint, nicht gegen die Peptasen[3]). Es wäre somit merkwürdig, wenn trotzdem die Katalase sofort und verhältnismäßig so kräftig von den Blutproteasen an-

[1]) *P. Wäntig* und *Steche*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 288.
[2]) *J. Baer* und *A. Loeb*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **53**, 1.
[3]) *U. Lombroso*, ref. Biochem. Centralbl. **14**, 585.

gegriffen wäre; oder müßte man eine peptische Wirkung annehmen, dann wären ja aber damit nicht die „Proteasen" bestimmt.

Eine Möglichkeit bleibt offen, daß beim Verdünnen des Blutes die Antiprotease ausgefüllt wird. Dieses in dem Falle, wenn sie ein Globulin wäre[1]). Dieses müßte viel eher eintreten als bei einer Verdünnung 1 : 200. Wenn wir aber die Abb. 2 betrachten, so sehen wir, daß nach einer Stunde bei Verdünnung 1 : 100 und 1 : 200 überhaupt kein Katalaseschwund eintritt. In dem Intervall von 1 : 200 und 1 : 400 offenbart er sich und bleibt auf demselben Niveau bis zur Verdünnung 1 : 1000.

Um die Frage experimentell zu entscheiden, wurde ein autolysischer Versuch mit defibriniertem Blut angestellt in der Verdünnung von 1 : 150 und 1 : 600. Sollte in diesem Intervall die Ausfällung von Antitrypsin stattfinden, dann müßte die Probe 1 : 600 in derselben Zeit stärker autolysiert sein, wie die Probe 1 : 150.

Tabelle I.

	Menge ccm	Nach *Barnstein* in koag. N mg	Dauer
Blut A, 1 : 150 . .	1	1,4	72 Std.
Blut A, 1 : 600 . .	1	1,6	
Blut B, 1 : 150 . .	1	1,5	48 Std.
Blut B, 1 : 600 . .	1	1,5	

Wie aus der Tabelle I zu ersehen ist, verläuft die Autolyse in beiden Konzentrationen in gleichem Maße, es fällt somit die oben gemachte Annahme fort.

A. Bach und *Zubkowa* (s. oben) haben nach ihrer Methode beim Menschen die Proteasezahl 3 bis 5 erhalten. Wir haben in vielen Versuchen Kaninchenblut auf die Proteasezahl untersucht und fanden dieselben Zahlen 3 bis 5. Der Katalaseschwund trat genau wie bei Mensch und Meerschweinchen ein, und doch hätte man geringere Zahlen erwarten müssen, weil gerade dem Kaninchen ein Hauptanteil der Blutproteasen — die Leucoprotease — fehlt[2]). Entsprechend autolysiert das Kaninchenserum sehr schwach und nach geraumer Zeit (eigene Versuche), man hat auch im Serum kaum Protease nachweisen können[3]). Klinisch wird das dadurch bestätigt, daß beim Kaninchen niemals dünnflüssige profuse Eiterungen, sondern höchstens Verkäsungen beobachtet wurden.

Diese Tatsachen scheinen darauf hinzuweisen, daß die Katalaseverarmung verdünnter Blutlösungen nicht auf einer Proteasewirkung

[1]) *T. Sugimoto*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **74**, 14.

[2]) *E. Orsini*, Biochem. Jahrb. **9**, 258.

[3]) *Pfeiffer*, Münch. med. Wochenschr. **20**, 1099, 1914; *Heilner* und *Pönsgen*, ebendaselbst **8**, 402, 1914.

beruhen kann. Endgültig konnte die Frage aber nur durch direkte Beweise geklärt werden und vor allen Dingen durch einen Vergleich des Katalaseschwundes einer 1 : 1000 verdünnten Blutlösung ohne Zusatz und mit Zusatz von Trypsin.

Die Resultate sind in den Tabellen II, III und IV zu ersehen.

Tabelle II. Versuch 324.

Zeit	Katalasezahl		
	I	II	III
Sofort	11,2	11,4	11,2
Nach $^1/_2$ Stunde .	10,0	10,2	10,0
Nach 1 Stunde .	8,8	8,7	8,8
Nach $1^1/_2$ Stunde	8,5	8,3	8,3
Nach 2 Stunden	8,5	8,0	8,0

I Blutlösung 1 : 1000.
II Blutlösung 1 : 1000, Natriumcarbonatgehalt 0,0001 Proz. (Kontrolle.)
III Blutlösung 1 : 1000, Natriumcarbonatgehalt 0,0001 Proz., Trypsingehalt 0,005 Proz.

Tabelle III. Versuch 333.

Zeit	Katalasezahl		
	I	II	III
Sofort	11,1	11,1	11,4
Nach 1 Stunde .	9,0	9,7	9,5
Nach 2 Stunden .	8,7	9,5	9,4
Nach $2^1/_2$ Stunden	8,3	8,5	8,7

I Blutlösung 1 : 1000.
II Blutlösung 1 : 1000, Natriumcarbonatgehalt 0,001 Proz. (Kontrolle.)
III Blutlösung 1 : 1000, Natriumcarbonatgehalt 0,001 Proz., Trypsingehalt 0,05 Proz.

Tabelle IV. Versuch 338.

Zeit	Katalasezahl		
	I	II	III
Sofort	16,8	16,8	17,0
Nach 2 Stunden	13,9	13,8	13,6

I, II, III wie im Versuch 333.

In allen Versuchen wurde die Katalasezahl nach *A. Bach* und *Zubkowa* (l. c.) bestimmt. Während der Dauer der Versuche befanden sich die einzelnen Kölbchen im Thermostaten bei 37°.

Wie ersichtlich, ist unter den obwaltenden Versuchsbedingungen von einem Angriff der Katalase durch Trypsin keine Rede, eher wird der Katalaseschwund durch die Sodalösung etwas zurückgehalten.

Dieses bedeutet aber auch, daß das Erepsin als ein Ferment vom peptolytischen Typus die Katalase unter diesen Bedingungen nicht angreift, denn das käufliche Trypsin enthält immer Erepsin und kann von diesem nur auf besondere Art (Fibrinklocke) getrennt werden, was gerade auch *Wäntig* und *Steche* in ihren Arbeiten erwähnen. Obige Versuche ergeben somit ein folgendermaßen formulierbares Resultat: *Unter dem Einfluß von Trypsin wird die „Proteasezahl" (nach Bach und Zubkowa) einer Blutlösung nicht verändert.*

Es sei auch ein spezieller und diesbezüglicher Versuch ausgeführt.

Tabelle V.

	Katalasezahl	Proteasezahl
Blutlösung 1:1000	9,5	3,2
Sodahaltige Blutlösung 1:1000 (Kontrolle)	9,7	2,7
Soda- und trypsinhaltige Blutlösung (1:1000)	9,5	2,7

Es schien uns von Bedeutung, festzustellen, in welchem Anteil des Blutes — dem Serum oder den Blutkörperchen — jener Faktor zu suchen ist, der den Katalaseschwund hervorruft.

Blut wurde defibriniert, Serum von den Zellelementen auf der Zentrifuge scharf getrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die Katalasezahlen sofort und nach einer gewissen Zeit bestimmt. Da der Katalasegehalt des Serums sehr gering ist und die Katalase des Gesamtblutes hauptsächlich an die Erythrocyten gebunden ist, so mußten wir Serum in Verdünnung 1 : 100 und die Erythrocyten in Verdünnung 1 : 5000 anwenden, um die *Bach*sche Versuchsanordnung beizubehalten.

Tabelle VI.

	Katalasezahl				
	Serum 1:100	Erythrocyten 1:5000	Serum 1:100	Erythrocyten 1:2500	Serum 1:100
Sofort	1,4	6,0	2,2	12,9	2,0
Nach 1 Std. bei 37° C	1,4	4,0	2,1	11,2	2,0

Wie ersichtlich, spielt sich die Katalaseverarmung nur in der Lösung roter Blutkörperchen ab, Serum enthält zwar geringe Mengen Katalase, die entsprechende Zahl bleibt aber nach Verlauf einer Stunde auf demselben Niveau. Dieses widerspricht um so mehr der Annahme, daß es die Blutproteasen sind, welche die Katalase angreifen, da ja gerade das Serum alle Arten der Proteasen enthält, ausgeschwemmte Organproteasen inbegriffen. Es hätte der Zweifel auftauchen können, daß bei der Serumverdünnung 1 : 100 das Antitrypsin die Proteasenwirkung hemmt — dann müßte durch Wegschaffung der Proteasehemmung die Proteasewirkung sich offenbaren. Ohne sich gezwungen zu sehen, den Einfluß von Chloroform auf Serum, wodurch die proteo-

lytischen Fähigkeiten des Serums bloßgelegt werden, *mit Jöbling* nach *Jöbling* zu erklären, ist das *Faktum* der Serumchloroformwirkung nicht wegzuleugnen und schon seit langem bekannt, es konnte auch neuerdings mit der *Jöbling*schen Methodik bestätigt werden[1]). Nach Behandlung von Serum mit Chloroform haben auch wir eine bedeutende Steigerung der Serumautolyse des öfteren wahrgenommen.

Es wäre zu erwarten, daß die Einwirkung eines solchen Serums auf die Katalase im Sinne eines erhöhten Katalaseschwundes sich auch würde konstatieren lassen, wenn eine solche Einwirkung bei den gegebenen Verhältnissen überhaupt bestände. Wie aus der Tabelle *VII* zu ersehen ist, trat aber dieses nicht ein.

Tabelle VII.

	Katalasezahl	Proteasezahl
Serum 1: 50	1,6	0
Serum 1: 50, vorerst nach *Jöbling* mit Chloroform behandelt	1,5	0
Erythrocyten	5,3	3,4

Somit scheint auch dadurch der Beweis geliefert zu sein, daß die Tryptasen nicht auf die Katalase in Blutlösungen einwirken. Zur Festigung dieses Befundes wurde auch versucht, ob das sonst antitryptisch wirkende ölsaure Natrium[2]) auch die angebliche protelysische Zerstörung der Katalase hemmt. Es stellte sich heraus, daß Zusatz von ölsaurem Natrium zur Blutlösung 1 : 1000 den Katalaseschwund der Lösung nicht beeinflußt — ein weiterer Beweis, daß der Katalaseschwund nicht auf einer Proteasewirkung beruht.

Tabelle VIII.

	Natr. olein.-Lösung in 10 ccm Blutlösung 1 : 1000								
	0	0,05 ccm	0,1 ccm	0,2 ccm	0	0,5 ccm	1 ccm	2,0 ccm	2,5 ccm
Katalasezahl sofort	13,3	13,3	13,3	13,3	12,1	12,1	12,1	12,2	12,4
Katalasezahl nach 2 Std. im Thermostaten	10,7	11,0	10,7	10,7	7,0	7,1	6,8	6,9	6,8

Zum Schluß möchten wir einen Versuch anführen, den zu erklären wir noch nicht imstande sind — darüber sollen weitere Versuche angestellt werden —, der aber, wie es uns scheint, auch gegen die Erklärung des Katalaseschwundes verdünnter Blutlösungen durch Proteasewirkung spricht. Bereitet man sich eine Blutkörperchen-

[1]) *Slowzoff* und *Xenofontowa*, Russ. phys. Journ. **2**, 261, 1919 (russisch).

[2]) *S. W. Jöbling* und *F. Peterssen*, Zeitschr. f. Immun. **1**, 23, 71, 1914; Chem. Ber. **1915**, I, 904; *Slowzoff* und *Xenofontowa*, l. c.; *Herbert Kahn*, Klin. Wochenschr. Nr. 29, S. 1364.

auflösung in destilliertem Wasser (Hämolysat) 1 : 1000 und läßt die Lösung bei 37° stehen, so tritt der öfters beobachtete Katalaseschwund ein, der anfangs rascher, später langsamer verläuft und nach etwa 2 bis 3 Stunden beinahe zum Stillstand kommt (s. auch Abb. 1).

Ganz anders verläuft der Prozeß, wenn man rote Blutkörperchen 1 : 1000 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Die Hämolyse tritt dann erst bei der Bestimmung der Katalasezahl ein. Unter diesen Bedingungen tritt sehr bald ein ganz enormer Katalaseschwund ein, nach einer weiteren Stunde und später wird aber *das frühere Niveau erreicht und sogar überschritten*. Tabelle IX und Abb. 3 illustrieren das Gesagte.

Tabelle IX.

Versuch 466.	Katalasezahl		Versuch 467.	Katalasezahl	
	Blutkörperchen in dest. Wasser 1 : 1000	Blutkörperchen in Kochsalzlösung 1 : 1000		Blutkörperchen in dest. Wasser 1 : 1000	Blutkörperchen in Kochsalzlösung 1 : 1000
Sofort	11,7	7,7	Sofort	13,6	10,4
Nach 40 Min. .	11,1	4,9	Nach 68 Min.	11,7	6,5
„ 75 „ .	10,2	6,5	„ 140 „	11,4	10,9
„ 115 „ .	9,7	7,0	„ 205 „	10,9	11,1
„ 130 „ .	9,5	7,5			
	bei 35° C.				

Aus der Tabelle IX ersehen wir vor allen Dingen die bekannte Tatsache, daß NaCl die Katalasewirkung hemmt: die Anfangszahlen sind in destilliertem Wasser höher. Sollte der weitere Katalaseschwund auch noch eine hemmende Salzwirkung bedeuten, so ist für die Regeneration keine Erklärung zur Hand.

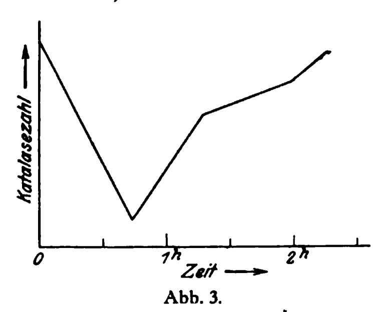


Abb. 3.

Höchstwahrscheinlich hat aber der Katalaseschwund in destilliertem Wasser wie in Kochsalzlösung dieselbe Ursache. Sollte es Proteasewirkung sein, die doch nur *endgültig* die Katalase zerstören kann? Von einer Katalaseaktivierung durch Kochsalz nach erfolgter Depression ist jedenfalls nichts bekannt. Es sind Versuche im Gange, diese merkwürdige Erscheinung zu erklären.

Zusammenfassend können wir sagen, daß *alle* von uns angestellten Versuche gegen die Möglichkeit einer Katalasezerstörung durch Blutprotease in verdünnten Blutlösungen sprechen.

Versuche zur Erfassung einer tierischen Urease.

Von

O. Steppuhn und Xenia Utkin-Ljubowzoff.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des staatlichen chemo-pharmazeutischen Forschungsinstitutes in Moskau.)

(Eingegangen am 19. Januar 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das harnstoffspaltende Ferment — die Urease — ist im Pflanzenreich ganz allgemein verbreitet, und zwar nicht nur in Samen und Keimpflanzen, sondern auch in Früchten[1]) und Stengeln[2]) (Stroh) hat man sie finden können. Die Bedeutung der pflanzlichen Urease ist klar: die Pflanze geht äußerst sparsam mit ihren Stickstoffquellen um; da der Harnstoff Oxydationsendprodukt darstellt, so würde er, wenn er bei den Wandlungen der Proteine über Arginin abzuspalten ist, unverwertet liegen bleiben müssen, wäre nicht durch die Urease Gelegenheit geboten, ihn in das verwertbare kohlensaure Ammoniak umzuwandeln. Eine andere Frage, die uns hier weiter nicht beschäftigen soll, ist, ob Arginin die einzige Bildungsquelle für den pflanzlichen Harnstoff darstellt, es ist ja klar, daß gerade die Urease uns daran hindert, richtigen Einblick in die quantitativen Verhältnisse der Harnstoffumwandlungen der Pflanzen zu gewinnen. Im tierischen Organismus sind die Bedingungen ganz andere. Das Oxydationsendprodukt — der Harnstoff — ist ein *Ausscheidungsprodukt*, wobei ein *Ausscheidungsapparat* vorhanden ist. Da sollte man ja vielleicht nicht nach einem anderen Modus suchen, der dazu führt, sich des Harnstoffs zu entledigen, mit anderen Worten: der tierische Organismus braucht keine Urease. Indessen gibt es doch Zustände, welche mit einer Verminderung der Harnstoffausscheidung und mit Vergrößerung der Ammoniakausscheidung einhergehen. Bei Acidose muß die sich pathologisch bildende Säure durch Ammoniak abgestumpft zur Ausscheidung gelangen, und sicher ist es und vielmals beobachtet, daß dieses, direkt oder vielleicht indirekt, auf Kosten des zur Ausscheidung gelangenden Harnstoffs geschieht.

Daran anknüpfend, versuchten wir Bedingungen zu schaffen, um den eventuell doch auch im tierischen Organismus vorhandenen Prozeß

[1]) *Fosse*, siehe ausführliche Literatur bei *A. Němec*, diese Zeitschr. **91**, 126.
[2]) *A. Němec*, l. c.

der Harnstoffspaltung unter solchen Verhältnissen zu fassen, wo für eine Ureasewirkung, wenn eine solche überhaupt vorhanden wäre, die günstigsten Bedingungen vorliegen.

Dabei wurden wir durch folgende Gedankengänge geleitet. Das Optimum der Pflanzenureasewirkung liegt bei neutraler, eher schwach saurer Reaktion. Wir haben dieses schon vor Jahren beobachten können, als wir die Methode der Harnstoffbestimmung im Urin nach *Hahn* und *Saphra*[1]) dahin modifizierten, daß das Endresultat nicht durch eine endgültige Titration des sich bildenden Ammoniumcarbonats bestimmt wurde, sondern durch eine Reihe von Titrationen in kürzeren Abständen, wodurch immer wieder eine schwach saure Reaktion und also günstige Bedingungen zur Weiterarbeit des Ferments hergestellt wurden[2]). Inzwischen ist ja die Anwendung der Puffer mit p_H nahe an 7 bei solchen Bestimmungen[3]) und das Optimum der Ureasewirkung bei $p_H = 7{,}2$ bis 7,5 durch die Arbeit von *P. Rona* und *György*[4]) bekannt geworden. Unsere eigenen Bestimmungen gaben eine noch mehr nach der sauren Seite verschobene Zahl, und zwar $p_H = 5$ bis 6 für Soja- wie für Robiniaurease, wobei allerdings nur die anfängliche Wasserstoffionenkonzentration bekannt war und die Dauer des Versuches 20 Stunden für Soja- und 3 Stunden für Robiniaurease umfaßte. Die dabei erhaltenen Werte sind durch die folgenden Kurven illustriert.

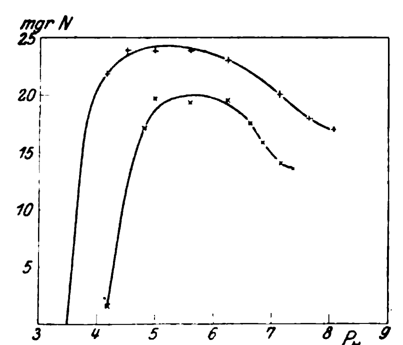


Abb. 1. Ureasewirkung bei verschiedener p_H.
++ Amerikan. Fermentpräparat.
×× Robinia-Fermentpräparat.

Daß für die Pflanzenurease das Optimum nicht im alkalischen Medium liegen kann, ist verständlich, denn der Pflanzensaft ist sauer und die Pflanzenfermente müssen ihre Tätigkeit bei einer solchen Reaktion entfalten können. Sollte eine tierische Urease existieren, so könnte wohl ihr Optimum nicht erst bei der schwach alkalischen Reaktion der Säfte und Gewebe liegen, denn dann würde der Harnstoff sich nirgends ansammeln können und könnte auch nicht als Ausscheidungsprodukt fungieren; gerade aber deswegen braucht der tierische Organismus keine Urease unter normalen Bedingungen.

Sollte aber die Neutralisation der sich pathologisch bei Acidosis bildenden Säuren durch Ammoniak auf dem Wege des im nötigen

---

[1]) *Hahn* und *Saphra*, Deutsch. med. Wochenschr. **9**, 430, 1914.
[2]) *Steppuhn* und *Wachmistrowa*, Klin. Med. (russ.) 1921, Nr. 4.
[3]) *van Slyke* und *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **19**, 141.
[4]) *P. Rona* und *György*, diese Zeitschr. **111**, 115.

Moment sich aus Harnstoffreserven bildenden Kohlensäureammons geschehen, so könnte gerade die intermediär auftretende Anreicherung an Wasserstoffionen als Regulator eines solchen Prozesses betrachtet werden. Dabei brauchte gar nicht eine aktive und anhaltende Säuerung der Säfte oder Gewebe einzutreten. Die sich pathologisch bildende Säure aktiviert die Urease, die Urease liefert das Ammoniak zur Neutralisation der Säure. Wäre dem so, dann müßte auch der bekannte Endzustand eintreten: Anreicherung im Harne von Ammonsalzen und Verminderung von Harnstoff. Wenn das Blut, wie *Michaelis* und *Davidoff*[1]) zeigten, äußerst zäh sich an $p_H = 7{,}5$ bis 7,6 hält, so konnten gerade dieselben bei Coma diabeticum $p_H = 7{,}12$ im Blute beobachten, also im Zustande, wo der Mechanismus der Neutralisation versagt. Im Moment der Freigabe der Säure in der Zelle wäre ja intermediär auch eine größere Säuerung denkbar.

Es gingen unsere Versuche also darauf hinaus, zu versuchen, ob einmal eine tierische Urease aus dem Gewebe durch schwache Säuren zu extrahieren sei, ob normales Gewebe in sauren Puffern harnstoffspaltende Eigenschaften besitze und ob bei ausgesprochener Acidose (Hunger, Diabetes) das Gewebe ureolytische Fähigkeiten gewinne. Vor allem mußte aber auch endgültig festgestellt werden, ob normales tierisches Gewebe Urease enthält.

Es schreibt zwar *C. Oppenheimer* in seiner Monographie[2]), daß tierische Urease nicht zu existieren scheine, es liegen aber Versuche vor, die in normalen tierischen Geweben Urease bewiesen zu haben glauben. Einmal berichtet *M. Jacoby*[3]) in einer älteren Arbeit über einen diesbezüglichen positiven Versuch mit Lebersaft; in jüngerer Zeit haben *I. Tanaka*[4]) in Milz, *G. Rovere*[5]) in der Thymus und *L. Buetow*[6]) in der Hypophyse ein harnstoffspaltendes Ferment gefunden[7]).

Die Versuche von *Tanaka* und *Buetow* sind, mit fabrikmäßig hergestelltem Organpulver durchgeführt, vollkommen gleich, was die Methodik, und sehr ähnlich, was die Resultate anbetrifft, und doch waren es nicht nur verschiedene Organe (Milz und Hypophyse), sondern auch verschiedene Tiere (Pferd und Schwein).

Es schien uns, daß, wenn überhaupt eine tierische Urease vorhanden wäre, sie doch vor allen Dingen in der Leber, in dem für die Harnstoffbildung verantwortlichen Organ, zu suchen ist. Eine Reihe von Versuchen wurde mit gewöhnlichem Leberpreßsaft angestellt. Bei einer anderen Reihe wurde der Leberbrei mit n/100 HCl bis zur schwach sauren Reaktion

[1]) *L. Michaelis* und *W. Davidoff*, diese Zeitschr. **46**, 131.

[2]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen 1914.

[3]) *M. Jacoby*, Zeitschr. f. phys. Chem. **30**, 149.

[4]) *T. Tanaka*, diese Zeitschr. **37**, 260.

[5]) *G. Rovere*, Biochem. Centralbl. **18**, 80.

[6]) *L. Buetow*, diese Zeitschr. **54**, 40.

[7]) Wir halten es für verfrüht, auf die Mitteilungen von *A. Lublin*, diese Zeitschr. **133**, und *P. György* und *Th. Stenström*, ebendaselbst **128**, einzugehen.

durchfeuchtet, kurze Zeit stehengelassen und dann abgepreßt. *Hahn* und *Saphra* bedienten sich bereits einer Extraktion der Urease mittels schwacher Säure aus Sojabohnen. Vor Exstirpation der Leber wurde bei den Kaninchenversuchen das Tier an der Carotis entblutet und durch die V. jugularis mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült. Die Methodik der Ammoniakbestimmung bleibt überall gleich: der Inhalt der einzelnen Kölbchen wurde in einen 400-ccm-Rundkolben unter Nachwaschen mit Wasser gegossen, 20 ccm 5proz. Magnesia, welche vorher ½ Stunde gekocht hatte, und 5 ccm Methylalkohol zur Verhütung von Schäumen hinzugegeben. Es wurde im Vakuum bei etwa 20 bis 25 mm bis zum Trocknen destilliert, wobei der Kolben auf dem Wasserbade bis 40° C erwärmt wurde. Das Ammoniak wurde in n/10 H_2SO_4 aufgefangen.

Tabelle I.

Kaninchenleber. Dauer 96 Stunden.

	2proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 7 ccm	Lebersaft ccm	N mg	Differenz
Versuch 3 . .	5	—	10	5	0,7	0
Kontrolle . .	—	5	10	5	0,7	
Versuch 5 . .	5	—	10	5	0,7	0,1
Kontrolle . .	—	5	10	5	0,6	

Tabelle II.

Kaninchenleber. Dauer 96 Stunden.

	10proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 7 ccm	Lebersaft mit n/100 HCl beh. ccm	N mg	Differenz
Versuch 2 . .	2	—	10	5	2,8	2,1
Kontrolle . .	—	2	10	5	0,7	
Versuch 7 . .	2	—	10	5	1,1	0,1
Kontrolle . .	—	2	10	5	1,0	
Versuch 8 . .	2	—	10	5	5,3	2,5
Kontrolle . .	—	2	10	5	2,8	
Versuch 10 .	1,5	—	10	5	2,3	0,3
Kontrolle . .	—	1,5	10	5	2,0	
Versuch 11 .	1,5	—	10	5	2,95	1,15
Kontrolle . .	—	1,5	10	5	1,80	

Tabelle III.

Pferd. Dauer 72 Stunden.

	10proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 7 ccm	Lebersaft mit n/100 HCl beh. ccm	N mg	Differenz
Versuch 13 .	2	—	10	5	2,8	2,5
Kontrolle . .	—	2	10	5	0,3	
Versuch 17 .	2	—	10	5	3,15	3,0
Kontrolle . .	—	2	10	5	0,15	
Versuch 19 .	2	—	10	5	2,25	1,9
Kontrolle . .	—	2	10	5	0,35	

Tabelle IV.

Hund. Dauer 72 Stunden.

	1 proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 7 ccm	Lebersaft mit n/100 HCl beh. ccm	N mg	Differenz
Versuch 20 .	1	—	10	1,5	0,14	0,14
Kontrolle . .	—	1	10	1,5	0	
				Organpulver		
Versuch 21 .	5	—	10	0,5 g	0,56	0,36
Kontrolle . .	—	5	10	0,5 g	0,2	
Versuch 23 .	5	—	10	0,5 g	0,85	0,75
Kontrolle . .	—	5	10	0,5 g	0,1	

Aus den angeführten Versuchen geht vor allem hervor, daß im gewöhnlichen Leberpreßsaft keine Urease aufzufinden ist, daß sie, soweit vorhanden, wahrscheinlich an die Zellelemente gebunden ist. Bei Behandlung des Gewebes mit schwacher Säure läßt sie sich extrahieren, auch im Trockenpulver ist sie faßbar. Die ureolytische Wirkung ist aber sehr schwach.

Wir können keine Mittelzahlen aus unseren Versuchen ziehen, obgleich ja Harnstoff, auch in 1proz. Lösung, immer im Überschuß vorhanden war. In den meisten Versuchen wurden auch 5 ccm Preßsaft verwandt, jedoch weichen die Hundeleberversuche davon ab: 0,5 g Organpulver bedeuten entschieden mehr wie 5 ccm Extrakt. Desto deutlicher kommt es zum Vorschein, daß die Hundeleber am wenigsten Urease enthält, die Pferdeleber am meisten. Unwillkürlich mußte man daran denken, daß diese geringe Menge Urease kein physiologischer Faktor des Organs ist, denn entsprechend unseren eingangs gemachten Betrachtungen wäre durch die Säureextraktion des Gewebes, durch die weitere Schaffung günstiger Wasserstoffionenkonzentration und lange Dauer des Versuches dem Ferment Gelegenheit geboten, seine Wirkung in größerem Maße zu offenbaren. Vielmehr schien die Annahme berechtigt, daß die in der Leber gefundene Urease ihre Existenz der eingenommenen Pflanzennahrung verdankt und unzerstört resorbiert werden konnte. Dann wird auch verständlich, daß die Hundeleber so ganz geringe Mengen enthält, schon bedeutend mehr die Pferdeleber, entsprechend der ureasehaltigen Hafernahrung.

Sollte die Urease im Tierkörper nur ein zufällig resorbierter Pflanzenbestandteil sein, dann könnte man auch die sonst befremdende Tatsache verstehen, daß auch Organe, wie z. B. die Hypophyse, Urease enthält (*Buetow*, l. c.). Wir haben entsprechende Versuche mit Ochsenhypophyse angestellt und konnten tatsächlich auch dort Urease finden.

Entsprechend unserer Annahme, daß die in der Leber auffindbare Urease der Pflanzennahrung entstammt, haben wir einem Hund im Ver-

Tabelle V. Ochsenhypophyse. Dauer 48 Stunden.

	2 proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 6,5 ccm	Trockenorgan g	N mg	Differenz
Versuch 30 .	5	—	10	0,3	1,4	1,1
Kontrolle . .	—	5	10	0,3	0,3	
Versuch 31 .	5	—	20	0,4	1,0	0,6
Kontrolle . .	—	5	20	0,4	0,4	

laufe von 3 Wochen jegliche Nahrung enthalten. Dadurch wurde einerseits jegliche Möglichkeit genommen, eine Urease von außen her in den Hundekörper hineinzubekommen, andererseits wurde durch dreiwöchiges Hungern ein Zustand geschaffen, der ganz allgemein zur Acidosis, erhöhter Ammoniakausscheidung und verminderter Harnstoffausscheidung führt. Nach Entbluten wurde wie gewöhnlich nachgespült und der Leberbrei bei niedriger Temperatur im Luftstrom getrocknet. Es wurde die beinahe zehnfache Menge Organpulver verwendet (4,5 g), das Resultat war = 0.

Tabelle VI.

	2 proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatgemisch p_H 6,8 ccm	Trockenorgan g	N mg	Differenz
Versuch 35 .	5	—	10	4,5	1,75	0
Kontrolle . .	—	5	10	4,5	1,75	

Aus dem Versuche geht hervor, daß bei Hungeracidosis keine Mobilisation von Urease stattfindet, daß im Gegenteil Nahrungsentziehung dazu führt, daß überhaupt keine Urease mehr in der Leber aufzufinden ist. Dieses bekräftigte unsere Annahme über den Ursprung der Leberurease. Nichtsdestoweniger muß gesagt werden, daß uns der Gegensversuch mißlang. Wir verfütterten Kaninchen bis zu 0,3 g Soja- und Robiniaureasepulver und konnten dann in der Leber keine nennenswerte Erhöhung der ureolytischen Wirkung konstatieren. Die Annahme, daß die überschüssige freie Salzsäure des Magens das Ferment zerstört, was unter den Bedingungen einer Resorption aus dem Speisebrei weniger zu befürchten ist, führte uns zum Versuche, die Fermentlösung am Magen vorbei in den Zwölffingerdarm einzuführen; die Leber dieses Tieres gab aber auch keine größeren Ureasezahlen. Somit ist über den Ursprung der normalerweise vorkommenden Urease nicht endgültig zu entscheiden. Es ist immerhin die Annahme möglich, daß die untersuchten zwei Ureasearten (Soja und Robinia) unter diesen Bedingungen sich anders verhalten mögen wie die Urease aus Heu, Hafer usw. Daß es verschiedene Ureasen gibt, ist ja sicher, nachdem *M. Falk*[1]) feststellen konnte, daß Serum die Sojaurease aktiviert,

[1]) *M. Falk*, diese Zeitschr. **59**, H. 3/4.

die Robiniaurease dagegen nicht. Man müßte, um die Frage weiter zu lichten, Urease aus Heu und Hafer herstellen und deren Resorptionsmöglichkeit untersuchen.

Um die Frage der eventuellen Mobilisation von Urease bei ausgesprochener Acidosis, also bei einem Zustande, wo die sich bildende Säure durch Ammoniak auf Kosten des ausgeschiedenen Harnstoffs abgestumpft wird, zu studieren, stellten wir einen Versuch an der Leber eines phlorrhidzindiabetischen Hundes an, dessen Harn ausgesprochene Symptome einer eingetretenen Acidosis zeigte (Aceton, Acetessigsäure). Der Versuch verlief negativ, wir konnten nur eine ganz geringe Menge ureolytischer Wirkung des Leberpulvers beobachten, die den normalen Zahlen entspricht.

Tabelle VII.

Dauer 44 Stunden.

	2 proz. Harnstofflösung ccm	Wasser ccm	Phosphatpuffer p_H etwa 7 ccm	Trockenorgan g	N mg	Differenz
Versuch 36 .	5	—	10	1	1,9	0,4
Kontrolle . .	—	5	10	1	1,5	

Es wird also bei Acidosis, begleitet mit Acetonkörperausscheidung im Harn vergrößerter Ammoniak- und verminderter Harnstoffausscheidung, wie es scheint, kein Harnstoff *aus einem Depot* mobilisiert, um die sich bildenden Säuren abzusättigen, und ist ein solcher Mechanismus dem tierischen Organismus fremd. Wenn dem aber so ist, so muß das nötige Ammoniak *auf dem Wege von Proteinen zu Harnstoff* abgefaßt werden, was ja zu demselben Endzustand führt: es wird dann weniger Harnstoff und mehr Ammoniak ausgeschieden.

Zusammenfassung.

1. Normale Leber von Kaninchen und Pferd und Hund enthalten geringe Mengen eines ureolytischen Ferments.

2. Im Säureextrakt der Leber läßt sich dieses Ferment besser nachweisen, wie im gewöhnlichen Preßsaft.

3. Es ist die Annahme nicht unberechtigt, daß diese geringen Mengen Ferment aus der Pflanzennahrung stammen.

4. Das Ferment scheint jedenfalls keine physiologische Bedeutung zu haben, da bei Acidosis keine Mobilisation des Ferments zwecks Absättigung von Säuren zu beobachten ist.

Zur Frage nach dem Mechanismus der Darmsekretion.

I. Mitteilung:

Gegenwärtiger Stand der Frage nach dem Mechanismus der Darmsekretion. Einige Beobachtungen über die Darmsekretion bei verschiedenen Bedingungen.

Von

S. A. Komarow.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Riga.)

(Eingegangen am 19. Januar 1924.)

I.

Nach der Entdeckung des Carnosins, Carnitins und Methylguanidins in *Liebigs* Fleischextrakt wies *R. Krimberg* (1) nach, daß diese Basen auch in ganz frischem Fleische enthalten sind, und daß dieselben präformierte Bestandteile des Muskelgewebes darstellen. Die bald darauf in *Krimbergs* Laboratorium ausgeführten Versuche zeigten ferner, daß die genannten Stoffe die Eigenschaften der Hormone besitzen, da dieselben direkt in den Kreislauf oder subkutan eingeführt, nicht nur einen deutlich sichtbaren Einfluß auf den Zirkulationsapparat, sondern stets auch eine sekretionserregende Wirkung auf die Drüsen des Magens ausübten. Diese Beobachtungen bildeten zum Teil die Grundlage für eine von *R. Krimberg* aufgestellte neue Theorie der Sekretion der Verdauungsdrüsen (2). Nach derselben soll der Sekretionsmechanismus aller Drüsen in seinen Grundzügen der gleiche sein, und zwar sollen als die einzigen direkten Erreger der Drüsen nur die im Blute zirkulierenden und hauptsächlich im Muskelgewebe entstehenden Hormone zu betrachten sein, während dem bei jeder normalen Sekretion ebenfalls mitwirkenden Nervensystem nur die Rolle eines regulatorischen Apparates zukommen soll.

Um die Gültigkeit dieser Theorie auch für die Sekretion der Darmdrüsen zu prüfen, wurde mir von Herrn Prof. *R. Krimberg* der Vorschlag gemacht, die Bedeutung der Hormone des Muskelgewebes für die Sekretion dieser Drüsen zu untersuchen.

Die Physiologie der Darmsekretion ist im Vergleich mit anderen Gebieten der Verdauungsphysiologie ziemlich wenig beachtet und erforscht worden. Infolgedessen darf es uns nicht verwundern, daß dieses Gebiet noch heute sehr wesentliche Lücken aufweist.

Eine jede physiologische Untersuchung beginnt mit der Erforschung der Funktion des Untersuchungsobjektes im Ruhezustande, d. h. frei von allen exogenen und endogenen Reizen, soweit es in der Macht des Experimentierenden liegt. Aber gerade die Frage über die Funktion der Darmdrüsen in solchem Ruhestadium kann jedoch keineswegs als einstimmig gelöst angesehen werden.

Wie bekannt, hat schon vor längerer Zeit *Boldyreff* (3) die von ihm entdeckte „periodische Tätigkeit" des Verdauungsapparates beschrieben, die in kurzen Zügen in folgendem besteht. Bei leerem Magen und völliger Ruhe der Magendrüsen beobachtet man nach Ablauf von je 1½, 2, 2½ Stunden eine 20 bis 30 Minuten andauernde Absonderung von Pankreassaft, Galle und Magenschleim, sowie eine Sekretion des Darmsaftes, begleitet von einer Reihe anderer Erscheinungen — Kontraktionen des Magens und des Darmes, Temperaturerhöhung, Leucocytose usw. Zwischen je zwei solchen „Perioden der Tätigkeit" des Verdauungsapparates finden weder Bewegungen noch irgendwelche Sekretion statt. Während jeder einzelnen Periode ergießt sich aus einem Darmabschnitt von etwa 25 cm Länge etwa 0,5, 1,0, 1,5 bis 2,0 ccm eines sehr fermentreichen Darmsaftes.

Die Angaben *Boldyreffs* über die Darmsaftsekretion bei leerem Magen sind von einer Reihe anderer Forscher bestätigt worden [*Leper* (4), *Brynk* (5)]. Von den neueren Forschern dagegen behauptet *Molnàr* (6), daß man aus der Dünndarmfistel nach *Thiry-Vella* bei nüchternem Zustande keine Sekretion beobachten könne. *Babkin* und *Ischikawa* (7) führen ihrerseits, ohne die Tatsache der periodischen Abscheidung des Darmsaftes aus der Fistel abzuleugnen, diese Erscheinung auf die gesteigerte peristaltische Darmbewegung zurück und sind der Ansicht, daß man von einer *wahren* periodischen Darmsaftsekretion nicht sprechen könne.

Trotzdem der physiologische Erregungsmechanismus der Darmsekretion von vielen Forschern wiederholt von verschiedenen Gesichtspunkten untersucht worden ist, sind im Ergebnis nur wenige sichere Tatsachen gewonnen.

Die wichtige Bedeutung verschiedener lokaler Reizungen mechanischer, chemischer oder elektrischer Natur, als Erreger der Darmsekretion ist augenscheinlich eindeutig festgestellt. Strittig aber bleibt immer noch die Frage, inwieweit das dabei ausgeschiedene Sekret als normaler Darmsaft anzusehen ist: so sind *Pawlow* und seine Mitarbeiter der Meinung, daß bei mechanischen und andersartigen lokalen Reizungen sich hauptsächlich Wasser abscheidet [*Sawitsch* (8), *Leper* (4), *Boldyreff* (3)], wobei als wahre Erreger der Fermentsekretion (Kinase) das Trypsin erscheint, welches diese Fähigkeit sowohl bei lokaler Berührung als auch „à distance" ausübt [*Sawitsch* (8)]. *Lombroso* (9) ist der Meinung, daß die Rolle der Erreger der Lipasesekretion vom Fett und von der Galle erfüllt wird [nach Ansicht *Jansens* (10) von der Gallensäure]; die Abscheidung der Amylase verstärkt sich, wie *Groen* (11) angibt, bei lokaler Einwirkung der Stärke auf die Darmschleimhaut.

London und *Dobrowolskaja* (12) verneinen zwar entschieden eine derartige Adaptation des Sekrets zu den verschiedenen Erregern.

Auch in der Frage der verschiedenen à distance-Wirkungen auf die Absonderung des Darmsaftes aus isolierten Darmabschnitten gehen die Meinungen der Forscher stark auseinander. Zweiffellos stellt der Verdauungsprozeß, im ganzen genommen, die denkbar mächtigste à distance-Einwirkung

auf die Sekretion eines isolierten Darmabschnittes dar. Leider stoßen wir aber gerade hier auf unverträgliche Widersprüche in den Angaben verschiedener Autoren. In den aus dem Laboratorium von *Pawlow* hervorgegangenen Arbeiten [*Glinsky* (13), *Schepowalnikow* (14), *Boldyreff* (3)] wird einstimmig betont, daß, wenn auch die Verdauung als ganzes auf die Sekretion einer isolierten Darmschlinge einwirkt, diese Einwirkung sich eher im Sinne einer Schwächung, als einer Steigerung der Sekretion geltend macht. Nach *Boldyreff* (3) wird die periodische Absonderung des Darmsaftes beim Verdauungsprozeß stark geschwächt oder sogar vollkommen unterbrochen. Mehrere Forscher konnten dagegen beim Verdauungsprozeß eine Absonderung des Darmsaftes aus der isolierten Darmschlinge beobachten [*Pregl* (15), *Nagano* (16), *Busch* (17) u. a.]; andere aber sahen sogar eine Steigerung der Darmsekretion [*Thiry* (18), *Goldschmidt* (19), *Pregl* (15), *Gumilewsky* (20), *Hamburger* und *Hekma* (21)]. Besonders entschieden behaupteten endlich *Frouin*, *Delezenne* und *Frouin* (23), daß aus der Fistel des Duodenums und Jejunums nach *Thiry* nach der Nahrungsaufnahme sich eine durch keinerlei lokale Reizung hervorgerufene Absonderung des Darmsaftes einstellt.

Im Zusammenhang mit der Frage über die Einwirkung des Verdauungsprozesses auf die Sekretion eines isolierten Darmabschnittes stehen die Untersuchungen über die Einwirkung einzelner chemischer Stoffe auf die Darmsekretion à distance. Es stellte sich nämlich heraus, daß von allen Nährstoffen nur die Fette als Erreger der Darmsaftsekretion aus isolierten Darmabschnitten, nach ihrer Einführung in den Verdauungstraktus in Betracht kommen [*Sawitsch* (8)]. Nach den Untersuchungen *Schepowalnokows* (14) hat die Buttersäure dieselbe Fähigkeit. *Delezenne* und *Frouin* (23) fanden, daß die Einführung von 200 bis 300 ccm 0,4 proz. Salzsäure in den Magen des Hundes eine lebhafte Darmsaftsekretion aus dem nach *Thiry* isolierten Duodenum und in geringerem Grade aus ebensolcher Fistel des oberen Jejunum hervorriefen.

Neben der Salzsäure und dem Magensaft können nach *Frouin* (24) auch Chloralhydrat, Äther und Seifen eine erregende Wirkung auf die Absonderung des Darmsaftes à distance ausüben. *Brynk* (5), der die Beobachtungen von *Delezenne* und *Frouin* über solche Einwirkung der Salzsäure auf die Darmsekretion speziell nachprüfte, schließt sich den Folgerungen der *Pawlow*schen Schule (*Sawitsch*, *Boldyreff*), die eine solche sekretionserregende Wirkung der Salzsäure strikt ableugnen, an. Nach *Boldyreff* (3) steigert die in den Darm gelangte Salzsäure keineswegs die Darmsekretion in den anderen Darmabschnitten, sondern erscheint lediglich als Hemmungsmoment für die „periodische Sekretion", die dadurch stark abgeschwächt wird.

Die weiteren Untersuchungen über den feineren Mechanismus der Darmsekretion wurden nach zwei Richtungen geführt: einerseits wurden seit langer Zeit Versuche gemacht, um die Bedeutung des Nervensystems in dieser Richtung aufzuklären. Andererseits unternahm man nach der Veröffentlichung der *Bayliss-Starling*schen (25) Sekretintheorie der Pankreassekretion Versuche, die möglichen humoralen Einflüsse auf die Darmsekretion festzustellen.

Die wichtige Bedeutung des Nervensystems für die Funktion der Darmdrüsen ergibt sich am anschaulichsten aus den Beobachtungen über die Folgen einer extra-intestinalen Durchtrennung der Darmnerven [*Moreau* (26), *Hanau* (27), *Mendel* (28), *Falloise* (29), *Molnàr* (6),

Benczur u. a.]. Als Ergebnis einer solchen Ausschließung des extraintestinalen Nervensystems tritt, wie alle Forscher, die sich mit der Untersuchung dieser Erscheinung befaßten, einstimmig hinweisen, eine anfangs profuse, nachher sich allmählich abschwächende, mehrere Wochen andauernde Darmsaftsekretion auf (*Molnàr*), die als „paralytische Sekretion" bekannt ist.

Man kann nun aus dieser unbestreitbaren Tatsache schließen, daß hauptsächlich sekretionshemmende Einflüsse durch die extra-intestinalen Nerven zu den Darmdrüsen geleitet werden. In letzter Zeit gelang es *Sawitsch* und *Soschestwensky*, durch direkte Versuche (Reizung des Vagus an Katzen im akuten Experiment) bei Anwendung einer seinerzeit von *Popielski* und *Pawlow* bei der Untersuchung der Innervation des Pankreas ausgearbeiteten analogen Methode, zu zeigen, daß zu den Darmdrüsen durch den Vagus sowohl sekretionserregende als auch hemmende Impulse verlaufen.

Die von vielen Autoren beobachtete, durch das Pilocarpin hervorgerufene Steigerung der Darmsekretion, die wiederum durch Atropin aufgehoben wird, spricht für die Annahme, daß das parasympathische Nervensystem im physiologischen Erregungsprozeß der darmsekretorischen Elemente eine wichtige Rolle spielt.

In hohem Grade interessant sind die Versuche, an die Lösung der Frage nach dem Mechanismus der Darmsekretion mittels parenteraler Einführung verschiedener Stoffe heranzutreten.

Das Sekretin von *Bayliss* und *Starling*, intravenös eingeführt, ruft, nach den Experimenten einiger Autoren [*Delezenne* und *Frouin* (23), *Roger* und *Garnier* (31)] zu urteilen, eine Sekretion aus dem oberen Teil der *Lieberkühn*schen und teilweise auch aus den *Brunner*schen Drüsen hervor.

Die Beobachtungen *Botazzis* (32), sowie *Botazzis* und *Gabrielis* (33), welche nach intravenöser Injektion von wässerigen und sauren Extrakten aus der Darmschleimhaut eine starke Abscheidung des Darmsaftes beobachteten, stehen in engem Zusammenhang mit den soeben erwähnten Versuchen. *Mironescu* (34) sah eine Sekretion des Darmsaftes nach subkutaner Injektion von Extrakten, welche aus den verschiedensten Organen: so aus der Speiseröhrenschleimhaut, aus dem Magenboden und Pylorus, dem Zwölffingerdarm, Dickdarm und Rectum, sowie aus den Speicheldrüsen der Leber und den Nebennieren mit Hilfe einer n/10 Salzsäurelösung gewonnen waren; ebensolche Extrakte aus dem Gehirn, dem Pankreas, den Muskeln und dem Herzmuskel blieben ohne Wirkung. Auch *Popielski* (36) ist der Meinung, die Absonderung des Darmsaftes (ebenso wie des Pankreassaftes) könne durch direkte Injektion von Extrakten aus den verschiedensten Organen ins Blut hervorgerufen werden. Die Wirkung dieser Extrakte erklärt er durch das Sinken des Blutdruckes und durch die Abnahme des Blutgerinnungsvermögens, welche Erscheinungen dank dem Vorkommen in denselben eines besonderen, von *Popielski* Vasodilatin genannten Körpers ihre Erklärung finden. Nach den Untersuchungen von *Molnàr* (6) ruft die subkutane Einführung von *Liebigs* Fleischextrakt (10 ccm einer 50proz. Lösung), wie auch von Panopeptonlösungen eine Steigerung der Sekretion des Darmsaftes aus der Fistel nach *Thiry-Vella*, bei durchschnittenen Nerven des Mesenteriums, hervor. *Hirata* (35) erhielt nach subkutaner und intravenöser Injektion von Molken und wässerigen Dekokten aus gerösteten Getreidekörnern eine kurzandauernde Darmsaftsekretion. In bemerkenswerter Weise wurde eine Sekretion des Darmsaftes auch durch

parenterale Einverleibung von Kochsalzlösungen bestimmter Konzentration ausgelöst.

Als sehr wichtig werden endlich die Beobachtungen *Frouins* (37) angesehen, nach welchen subkutane oder intravenöse Einführung des natürlichen oder aufgekochten Darmsaftes selbst eine Sekretion aus den mittleren Teilen des Dünndarmes hervorrufen soll. Nach *Frouin* zeichnet sich die erregende Einwirkung des Darmsaftes auf die Darmdrüsen durch große Spezifizität aus, da eine Sekretion aus anderen Drüsen bei solchen Experimenten nicht beobachtet wurde.

Die erwähnten Beobachtungen über die erregende Einwirkung von Extrakten verschiedenen Ursprungs auf die Darmsekretion, bei ihrer parenteralen Einverleibung, wurden, wie bekannt, als Grundlage zur Aufstellung einiger Theorien über den Mechanismus der Darmsekretion verwandt. So erscheint nach der Meinung von *Delezenne* und *Frouin* (23), welche auch von mehreren anderen Autoren geteilt wird, das *Bayliss-Starling*sche Duodenalsekretin als einer unter den normalen physiologischen Erregern nicht nur für die Absonderung des Pankreassaftes und der Galle, sondern auch für die Sekretion des Darmsaftes, wobei derselbe auf humoralem Wege einwirken soll.

Wie bekannt, vertritt *A. Bickel* (38) in bezug auf den Mechanismus der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen die Ansicht, nach welcher „das die neuro-glandulären Drüsenapparate umspülende Blut kontinuierlich die Drüsenzellen zur Funktion reizt, daß aber der intermittierende Charakter der Tätigkeit aller Verdauungsdrüsen mit teilweiser Ausnahme der Leber durch nervöse Interventionen zustande kommt". Nach den Versuchen *Molnàrs* ist dieser Mechanismus auch für die Darmdrüsen zutreffend. Er erklärt die von ihm bei seinem Hunde nach Durchschneidung der Mesenterialnerven beobachtete Sekretion durch den Umstand, daß dabei die normalerweise durch die Mesenterialnerven hindurchgeleiteten hemmenden Einflüsse wegfallen, wodurch die kontinuierlich im Blute kreisenden chemischen Reizstoffe die Möglichkeit erhalten, ihre erregende Wirkung auf die sekretorischen Elemente des Darmes auszuüben. Als solche kontinuierlich im Blute kreisende chemische Erreger gelten nach den Versuchen *Bickels* und seiner Mitarbeiter (*Mironescu, Hirata, Molnàr*) das *Bayliss-Starling*sche Pankreassekretin, das *Edkins*sche Magensekretin als auch die verschiedenartigsten sekretinähnlichen Stoffe, welche zum Teil als präformierte Bestandteile in der Nahrung enthalten sind; zum Teil jedoch auch während des kulinaren Zubereitungsprozesses und endlich bei der Umwandlung der Nahrung im Verdauungskanal entstehen können. Der Angriffspunkt aller dieser Substanzen soll nach der Meinung der genannten Autoren — der „neuro-glanduläre" Drüsenapparat sein.

Frouin (37) vertritt endlich die Ansicht, der sich auch *Bayliss* und *Starling* (25b) anschließen, daß nämlich der unter Einfluß verschiedener Agenzien sich in den oberen Darmabschnitten absondernde Darmsaft nach seiner Resorption auf humoralem Wege eine nicht zu unterschätzende eminente Rolle beim physiologischen Erregungsprozesse der Sekretion aus den unteren Teilen des Darmes spiele.

In betreff der angeführten Theorien würde ich mir jedoch erlauben, hier zu bemerken, daß wir uns zu den parenteralen Einverleibungsversuchen mit so komplizierten organischen Gemischen, wie es ja die aus den verschiedenen tierischen Organen, vegetabilischen Stoffen usw. gewonnenen Extrakte „in toto" darstellen, mit größter Vorsicht verhalten möchten, da

man, worauf bereits *R. Krimberg* (2) hingewiesen hat, bei solcher Versuchsart sehr leicht in Irrtum über ihre sekretionserregende Fähigkeit verfallen kann, weil in derartigen Auszügen gewöhnlich stets größere Mengen irrelevanter und die Sekretion sogar störender Substanzen mitenthalten sind. Dies bezieht sich besonders auf solche Extrakte, die nach dem bekannten Verfahren zur Darstellung des Sekretins von *Bayliss* und *Starling* (39) durch Kochen der Gewebe mit anorganischen Säuren gewonnen werden; bei solcher Gewebsbearbeitung haben wir nämlich keine Garantie dafür, „daß statt der von uns erwarteten präformierten Substanzen nicht deren Umwandlungs- oder gar Zersetzungsprodukte auftreten". Meinerseits halte ich es für wichtig, hier zu bemerken, daß unabhängig von den soeben erwähnten methodischen Einwänden bei der Wertung der in Rede stehenden Versuche notwendigerweise der Umstand mit in Betracht gezogen werden muß, daß bei denselben *alle Bedingungen für die Entstehung des anaphylaktischen Zustandes vorhanden waren*[1]).

Zweifellos kann schon die bloße Operation am Tiere zwecks Auflegung einer Darmfistel als sensibilisierendes Moment erscheinen, weil dabei unvermeidlich Gewebseiweißstoffe und wegen der großen Schwierigkeit, bei Hunden eine „prima intentio" zu erzielen, öfters auch Entzündungsprodukte aus der granulierenden Operationswunde, sowie endlich Verdauungssäfte ins Blut gelangen. Daher wäre es durchaus nicht verwunderlich, wenn schon sogar die erste Injektion solcher höchst kompliziert zusammengesetzter, sicherlich größere oder geringere Quantitäten blutfremder Proteine und hochmolekulare Abbauprodukte derselben, und eventuell auch Mineralsalze in gesteigerter Konzentration enthaltende Extrakte, völlig entwickelte anaphylaktische Erscheinungen hervorrufen könnte. In diesem Zusammenhang würde ich mir erlauben, nur darauf hinzuweisen, daß sogar ein dem Anschein nach so unbedeutender Eingriff, wie die subkutane oder intravenöse Injektion von Kochsalzlösung schon genügt, um bei anaphylaktisch gemachten Kaninchen eine Steigerung der Temperatur [*Davidsohn* und *Friedemann* (40)] hervorzurufen und sogar den Tod der Tiere zu bewirken [*Heilner* (41)]. Bekanntlich setzen *Davidsohn* und *Friedemann* diese Beobachtungen mit dem Salzfieber der Säuglinge in Parallele und erklären die erhöhte Reaktionsfähigkeit des kranken Säuglings (*Finkelstein*) unter Heranziehung des Anaphylaxiebegriffes. Unter den verschiedenen Symptomen im Bilde des anaphylaktischen Chocks speziell bei Hunden treten bekanntlich außer einer im Mittelpunkte aller Erscheinungen stehenden peripher ausgelösten Vasodilatation, die ihrerseits eine sehr intensive Blutdrucksenkung zur Folge hat [*Biedl* und *Kraus* (42), *Nolf* (44), *Arthus* (43) u. a.], sowie einer Verminderung der Blutgerinnungsfähigkeit, einer Leukopenie (*Biedl* und *Kraus*) und einem gesteigerten Lymphfluß [*Calvary* (45)] einige Erscheinungen seitens des *Magendarmkanals*, was für uns von ganz besonderem Interesse ist, in den Vordergrund. Die Därme zeigen meist eine starke Füllung der Blutgefäße, Injektion der ganzen Serosa, Abgang blutschleimiger Stühle, kurz, das Bild einer schweren Enteritis, so daß man von einer „Enteritis anaphylactica" sprechen kann [*Schittenhelm* und *Weichardt* (46)].

---

[1]) In der Zukunft habe ich die Absicht, eine Arbeit über die Tätigkeit der Verdauungsdrüsen im anaphylaktischen Zustande zu publizieren, in welcher auch die oben angeführten Versuche speziell in dieser Richtung ausführlicher besprochen werden sollen.

Eine sehr auffallende Analogie macht sich bemerkbar zwischen dem soeben erwähnten anaphylaktischen Symptomenkomplex beim Hunde einerseits und den von *Popielski* (47) beobachteten Erscheinungen an Hunden nach Einführung von aus den verschiedensten Organen und Geweben gewonnenen Auszügen in toto andererseits. Wie schon erwähnt, hat *Popielski* gefunden, daß alle solche Auszüge nicht nur eine Sekretion der Verdauungsdrüsen, sondern auch stets eine Blutdrucksenkung sowie eine Abschwächung der Blutgerinnungsfähigkeit bewirken.

Nur auf diesem Wege, d. h. als eine anaphylaktische Erscheinung, läßt sich meiner Meinung nach die so rätselhaft scheinende Tatsache der auslösenden Wirkung einer 1proz. Kochsalzlösung auf die Darmsekretion bei subkutaner und intravenöser Injektion in den Experimenten *Hiratas*, sowie der Umstand, daß die Einführung von 5 ccm Darmsaft ins Blut eine Sekretion von 19 ccm Darmsaft aus relativ geringem Darmabschnitt in den Experimenten *Frouins* hervorrief, am besten erklären. Legen wir dagegen dieses letzte Experiment im Sinne *Frouins* aus, so müßte das Maß der durch den resorbierten Darmsaft hervorgerufenen Darmsekretion unter physiologischen Bedingungen in der Tat viel zu enorm sein.

Wenn wir diese Erwägungen in Betracht ziehen, so wird es uns nicht als unmöglich erscheinen, daß der von einigen Autoren bei parenteraler Einverleibung erzielte Sekretionseffekt nicht der spezifischen Wirkung bestimmter Erreger, sogenannter Sekretine, zuzuschreiben ist, sondern daß derselbe ganz oder wenigstens teilweise als die Folge unspezifischer Reize, als eine Allergieerscheinung, auftritt.

Nach dieser kurzen Erwägung des betreffenden Versuchsmaterials fühle ich mich berechtigt, die Meinung auszusprechen, daß die auf diesem Material basierenden Theorien des Mechanismus der Darmsekretion nicht genügend begründet sind, und daß weitere Untersuchungen in dieser Frage dringend notwendig sind. Einerseits höchst wünschenswert sind Versuche zur Aufklärung der Bedeutung der erwähnten unspezifischen Reize bzw. des Allergiezustandes im Prozesse der Darmsekretion, wenn nicht unter physiologischen, so doch unter pathologischen Bedingungen; andererseits scheint mir aber besonders wichtig die Anwendung neuer, zuverlässigerer Methoden zwecks Isolierung der vermutlichen spezifischen sekretionserregenden Stoffe aus Extrakten verschiedenen Ursprungs.

Aus oben angeführter Übersicht der Fachliteratur folgt notwendigerweise der Schluß, daß die Physiologie der Darmsekretion für uns sogar in den wesentlichsten Punkten ein noch wenig bekanntes Gebiet bleibt.

II.

Wie eingangs erwähnt, hatten wir uns zur Hauptaufgabe in dieser Arbeit gestellt, auf experimentellem Wege an die Lösung des Problems der Existenz einer chemischen Korrelation in der Tätigkeit des Drüsenapparates des Darms einerseits und des Muskelgewebes andererseits heranzutreten. Diese Aufgabe verlangt natürlich eine Versuchsanordnung, bei welcher alle physiologischen Verhältnisse möglichst streng beachtet werden; daher durften für uns nur die absolut normale Darmschleimhaut völlig gesunder, zweckmäßig operierter Tiere und

ebenso nur die normalen Muskelgewebsbestandteile als Untersuchungsobjekte in Betracht kommen.

In allen Fällen, in denen nach der Existenz einer chemischen Korrelation in der Tätigkeit verschiedener Organe gesucht wird, und in denen zu diesem Zwecke eine Aktivitätsprüfung der intravitalen Bestandteile eines Organs in bezug auf die Funktion eines anderen durch Einführung derselben in das Blut unternommen werden soll, können, wie *R. Krimberg* (2) betont, einwandfreie Resultate nur dann erzielt werden, wenn diese Stoffe einerseits isoliert und in chemisch reinem Zustande, andererseits nicht in allzu großen, am besten aber in den minimalsten Dosen ins Blut injiziert werden. Sind aber die wirksamen Bestandteile eines Organs mit den zurzeit gebräuchlichen Methoden nicht isolierbar, so sind wir natürlich gezwungen, Organextrakte einzuführen. In diesem letzten Falle jedoch muß folgendes beachtet werden. Erstens muß die angewandte Extraktionsmethode von allen Momenten, welche die Bildung künstlicher Umwandlungs- bzw. Zersetzungsprodukte der im Organe enthaltenen Substanzen zu begünstigen imstande sind, frei sein; und zweitens ist es zweckmäßiger, die gewonnenen Extrakte nicht als solche, sondern erst nach vorheriger Zerlegung in einzelne Fraktionen anzuwenden. Als die zu diesem Zwecke geeignetste Fraktionierungsmethode von Gewebsextrakten verschiedener Art hat sich nach den Erfahrungen des hiesigen Laboratoriums das von *Gulewitsch* und *Krimberg* (48, 49) ausgearbeitete Verfahren zur Isolierung einiger neuer stickstoffhaltiger Basen aus dem Fleischextrakt erwiesen.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde unsere besondere Aufmerksamkeit auf die Untersuchung der physiologischen Aktivität in bezug auf die Darmsekretion von chemisch reinen, im Muskelgewebe höherer Tiere enthaltenen stickstoffhaltigen Basen — und zwar des Carnosins, Methylguanidins, Carnitins und Cholins —, sowie einiger anderer, mit ersteren in genetischem Zusammenhang stehenden Substanzen — l-Histidin, β-Alanin, Kreatin und Kreatinin — gerichtet. Da diese Stoffe normalerweise alle, außer vielleicht dem β-Alanin, nicht nur in lebenden Muskeln, sondern auch zweifellos im Blute enthalten sind, muß die direkte unmittelbare Einführung derselben in das Blut verständlicherweise der natürlichste und richtigste Weg zur Prüfung ihrer physiologischen Aktivität sein; der einzige neue Faktor, der bei einer solchen Versuchsanordnung durch den Experimentator ins Leben des Organismus hineingetragen wird, kann in solchem Falle nur die im Blute auftretende Konzentrationsveränderung eines seiner normalen Bestandteile sein. Zwecks Auffindung der wirksamen Stoffe unter den in chemisch reinem Zustande noch nicht isolierten Bestandteilen des Muskelgewebes wurde auch

die Untersuchung über den Einfluß einzelner, nach dem Verfahren von *Gulewitsch* und *Krimberg* aus wässerigen Extrakten aus vollständig frischem Rindfleisch gewonnener Fraktionen ins Auge gefaßt.

Der größte Teil meiner Untersuchungen wurde an drei Hunden ausgeführt, denen eine Fistel nach *Thiry-Vella* im oberen Teile des Jejunums angelegt worden war.

Nr. 1. Junge Hündin. Wurde mit einer nach *Thiry-Vella* in der ersten Jejunumschlinge angelegten Fistel versehen. Darmnaht etwa 10 cm entfernt von der Plica duodenojejunalis. Länge des isolierten Darmabschnittes etwa 30 cm. Nach einer Reihe von Versuchen wurde eine Operation der einfachen Magenfistel an ihr ausgeführt. Die ersten Experimente wurden ein halbes Jahr nach der ersten Operation, die zweite Reihe von Versuchen einen Monat nach der zweiten Operation, als der Verheilungsprozeß vollkommen beendet war, begonnen.

Nr. 2. Junge Hündin. Operiert ebenso wie Nr. 1, d. h. mit einer nach *Thiry-Vella* angelegten Fistel aus der ersten Jejunumschlinge und einer einfachen Magenfistel versehen. Länge des isolierten Darmabschnittes etwa 30 cm. Die die Darmkontinuität wieder herstellende Naht wurde während der zweiten Operation (Magenfistelanlegung) in etwa 9 cm Entfernung von der Plica duodenojejunalis gefunden. Die Versuche sind etwa ½ Jahr nach der zweiten (9 Monate nach der ersten) Operation begonnen.

Nr. 3. Junger Hund. Mit einer nach *Thiry-Vella* im oberen Teile des Jejunums angelegten Fistel. Länge des isolierten Darmabschnittes etwa 40 cm. Die die Darmkontinuität herstellende Naht etwa 15 cm unter der Plica duodenojejunalis. Die Versuche sind 2 Wochen nach erfolgter Operation begonnen worden.

III.

Ehe wir an die Veranstaltung von Versuchen, die zur Lösung des uns speziell interessierenden Problems beitragen könnten, herantreten, erscheint es verständlicherweise notwendig, die Funktion der Darmdrüsen unserer Versuchstiere unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu prüfen. Wenn wir in Betracht ziehen, daß sogar in den allerwesentlichsten Fragen der Physiologie der Darmsekretion große Meinungsverschiedenheiten herrschen, so müssen derartige Untersuchungen meines Erachtens außer in methodischer Hinsicht auch noch an sich von großem Werte sein.

Besonderes Gewicht legten wir auf die Erforschung der Funktion der von keinerlei Lokal- oder „par distance"-Reizanwendung beeinflußter Darmdrüsen nüchterner Tiere, sozusagen im „Ruhezustand". Diese an sich interessante Frage ist, wie *R. Krimberg* schon vor längerer Zeit bemerkte, von äußerst wichtiger Bedeutung auch für die Beurteilung des Sekretionsmechanismus. In dieser Richtung wurde eine große Anzahl von speziellen Versuchen, im ganzen an sechs, meist Polyfistelhunden (etwa 100 protokollierter und eine noch viel größere Zahl unprotokollierter Versuche) veranstaltet. Es gelang uns, die Existenz einer „periodischen Sekretion" des Darmsaftes aus den

*Thiry-Vella*schen Fisteln bei unseren Versuchstieren im nüchternen Zustande absolut sicher festzustellen, welche genau in der von *Boldyreff* zuerst beschriebenen Art verlief.

Versuch 1[1]).

Hund 4 (*Thiry-Vella*sche Fistel des oberen Jejunums).
Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
12h30′	—	Beginn d. Beobachtung[2])	4h30′	0	
12 45	1,7		4 45	0	
1 00	0		5 00	0	
1 15	0		5 15	0	
1 30	0		5 30	2,8	
1 45	0		5 45	0	
2 00	2,2		6 00	0	
2 15	0		6 15	0	
2 30	0		6 30	2,0	
2 45	0		6 45	0	
3 00	0		7 00	0	
3 15	2,3		7 15	1,6	
3 30	0		7 30	0	
3 45	0		7 45	0	
4 00	0		8 00	0	
4 15	0				

Versuch 2.

Hund 1 (achter Monat nach der Operation).
Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
10h20′	—	Beginn der Beobachtung	12h30′	1,0	Knurren
10 30	0,1		12 40	1,0	
10 40	0		12 50	0	
10 50	0,1		1 00	0	
11 00	0		1 10	0	
11 10	0		1 20	0	
11 20	1,7	Knurren in Gedärmen	1 30	0	
11 30	0,1		1 40	1,3	Knurren
11 40	0		1 50	1,0	
11 50	0		2 00	0,1	
12 00	0		2 10	0	
12 10	0		2 20	0	
12 20	0				

[1]) Dieses Protokoll ebenso wie die folgenden wird selbstverständlich nur als ein Beispiel aus einer Reihe analoger Versuche angeführt.
[2]) Erster Versuch am 18. Tage nach der Operation.

Versuch 3.

Hund 3 (neunter Monat nach der Operation).
Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
10h00'	—		5h45'	0	
11 00	0		6 00	0	
12 00	0		6 15	2,1	
1 00	0		6 30	0	
2 00	0		6 45	0	
3 00	0		7 00	0,9	
4 00	0		7 15	0	
4 15	0		7 30	0	
4 30	1,3		7 45	0	
4 45	0		8 00	1,9	
5 00	2,2		8 15	0	
5 15	0		8 30	0	
5 30	2,0				

Versuch 4.

Hund 2 (elfter Monat nach der Operation).
Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
12h40'	—	Beginn der Beobachtung	3 30'	0	
12 50	0		3 40	0	
1 00	0		3 50	1,3	Knurren
1 10	0		4 00	0	
1 20	0		4 10	0	
1 30	0		4 20	0	
1 40	0	Knurren (im Gedärm)	4 30	0	
1 50	1,2		4 40	0	
2 00	0		4 50	0	
2 10	0		5 00	0	
2 20	0		5 10	0	
2 30	0		5 20	1,5	Knurren
2 40	0		5 30	1,9	
2 50	0		5 40	0	
3 00	0		5 50	0	
3 10	0		6 00	0	
3 20	0				

Bei leerem Magen außerhalb der Verdauung durchschnittlich alle 1 bis 1½ bis 2 Stunden, während jegliche auch noch so minimale Darmsaftausscheidung aus der Fistel aussetzt, sogenannte „*Ruheperiode*", tritt die „Tätigkeit" des Verdauungsapparates ein, welche sich in folgender Weise entfaltet. Zuallererst wird in den in die Haut eingenähten Darmteilen eine mit bloßem Auge sichtbare Peristaltik bemerkbar, begleitet von hörbarem Knurren in den Gedärmen; dann beginnt der Darmsaft, anfangs aus dem oralen und nach 1 bis 2 Minuten auch aus dem analen Darm-

abschnitt herauszufließen (zuerst erscheinen feste Teilchen, Schleimklümpchen, später aber auch dünnflüssiger Darmsaft). Diese „Tätigkeitsperiode“ dauert 5 bis 30 Minuten (durchschnittlich 10 bis 15 Minuten) und im Laufe dieser Zeit werden in der Regel 1,5 bis 3,0 (von 0,2 bis 6,0) ccm Darmsaft (bei etwa 30 cm Länge des isolierten Darmabschnittes) sezerniert. Dieser „periodische Darmsaft“ enthält stets die fürs betreffende Tier als maximal geltende Fermentmenge (untersucht wurden: Erepsin, Lipase, Invertin und Amylase). Neben der Darmsaftsekretion werden in der „Tätigkeitsperiode“ auch andere Erscheinungen beobachtet. Aus der Magenfistel scheidet sich regelmäßig Schleim in einer Menge von 2 bis 6 ccm aus; derselbe enthält stets bedeutende Mengen von Pepsin; seine Reaktion ist meist alkalisch oder neutral auf Lackmus, ziemlich oft aber ist sie sauer und wir finden sogar freie Salzsäure. Zuweilen wird auch Galle (etwa 3 bis 5 ccm) aus der Magenfistel abgeschieden.

Diese „periodische Tätigkeit“ des Verdauungsapparates bei unseren Tieren zeichnet sich durch außerordentliche Regelmäßigkeit aus; denn sowohl die in der Tätigkeitsperiode sich absondernden Darmsaftmengen, wie auch die Dauer der Tätigkeits- und Ruheperioden sind gewöhnlich tagtäglich nur äußerst geringen, in engen Grenzen sich vollziehenden Schwankungen unterworfen. In der ersten Zeit nach Abschluß des Verdauungsprozesses ist die „periodische Sekretion“ stärker entwickelt, die Pausen sind kürzer und die Mengen des in der Tätigkeitsperiode (besonders während der ersten Periode) sich absondernden Sekrets größer als später nach vielen Stunden des Nüchternseins.

Jedoch nicht immer trägt die bei leerem Magen erfolgende spontane Darmsaftsekretion solch einen regelmäßig ausgeprägten periodischen Charakter; zuweilen, allerdings sehr selten, kann diese auch ohne jegliche sichtbaren Gründe kontinuierlich in Mengen von 0,1 bis 0,2 bis 0,3 ccm alle 10 Minuten erfolgen. Aber auch in diesem letzteren Falle weist die kontinuierlich stattfindende Sekretion deutlich bemerkbare Wellen einer periodischen Verstärkung auf.

Die Ermüdung des Tieres beeinflußt die „periodische Sekretion“, schwächt dieselbe ab, oder führt zu einer Störung der Regelmäßigkeit ihres Verlaufs.

Atropinum sulfuricum in Mengen von 0,5 bis 1,0 mg auf 1 kg Gewicht schwächt die periodische Darmsaftsekretion stark ab; die Dauer der Ruheperioden vergrößert sich bis auf 4 bis 5 Stunden, die Menge des im Laufe der Tätigkeitsperiode sich absondernden Darmsaftes reduziert sich bis auf ein Minimum von 0,1 bis 0,2 ccm.

Wir müssen jedoch hinzufügen, daß während einer völlig entwickelten charakteristischen Atropinvergiftung des Tieres (*maximale* Tachycardie und Mydriasis, *vollständige* Trockenheit der Schleimhäute usw.) keine spontane Darmsekretion mehrere Stunden lang beobachtet werden konnte (Versuche 5 und 6).

Auf unsere Beobachtungen über die Veränderung der „periodischen Tätigkeit“ der Darmdrüsen unter einigen speziellen Versuchsbedingungen, sowie auf die Beurteilung des Mechanismus derselben wird späterhin näher eingegangen werden.

Große Aufmerksamkeit wurde auch auf die Untersuchung der Funktion von Drüsen eines isolierten Darmabschnittes unter Einfluß verschiedener par distance-Einwirkungen, insbesondere derjenigen unter Einfluß des Verdauungsprozesses in toto, gerichtet.

Versuch 5.

Hund 3 (8 kg).

Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
3h 15'	—	95	Beginn der Beobachtung	5h 45'	0	240	
3 30	0	95		6 00	0	240	
3 45	1,3	95		6 15	0	240	
4 00	0	95		6 30	0	240	Mydriasis completa, Pupillenreflex auf Licht fehlt, Schleimhäute trocken, halluciniert
4 15	1,4	95	Inj. 0,006 Atropin. sulf. subkutan	6 45	0	220	
4 30	0	260	Mydriasis completa, Pupillenreflex auf Licht fehlt, Schleimhäute trocken, halluciniert	7 00	0	200	
4 45	0	240		7 15	0	180	
5 00	0	240		7 30	0	170	
5 15	0	240		7 45	0	180	
5 30	0	240		8 00	0	160—170	

Versuch 6.

Hund 3 (8 kg).

Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
1h 00'	—	90	Beginn d. Beobachtung	3h 15'	0	230	Mydriasis incompleta
1 15	0	90		3 30	0	215	Inj. 0,001 Atropin. sulf. subkutan
1 30	0	90					
1 45	0	90		3 45	0	215	
2 00	0	90		4 00	0	215	
2 15	3,4	95		4 15	0	215	Inj. 0,002 Atropin. sulf. subkutan
2 20	0,2	95	Inj. 0,002 Atropin. sulf. subkutan	4 30	0,2	215	Mydriasis completa. Pupillenreflex a. Licht fehlt
2 26	0	100					
2 27	0	240	Pupille normal	4 45	0	215	Inj. 0,001 Atropin. sulf. subkutan
2 30	0	300	Pupillenreflex a. Licht, geschwächt, Schleimhäute trocken, Aufregung	5 00	0	215	
2 35	0	280		5 15	0	215	Schleimhäute trocken
2 45	0	260					
3 00	0	240					

Auf Grund einer großen Anzahl von Versuchen können wir nun entschieden behaupten, daß die bei Fehlen lokaler Reizeinwirkungen an nüchternen Tieren beobachtete periodische Sekretion aus *Thiry-Vella*scher Fistel sich unmittelbar nach der Fütterung stark abschwächt; die Ruheperioden werden weit andauernder, die Mengen des abgesonderten Saftes viel geringer. Öfters wird sogar die „periodische Sekretion“ des Darmsaftes aus der *Thiry-Vella*schen Fistel auf viele Stunden vollkommen unterbrochen; auch diese unsere Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen *Boldyreffs*.

Versuch 7.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
10h00'	—	Beginn der Beobachtung	1h45'	0	
10 15	0		2 00	0	
10 30	0		2 15	0	
10 45	0		2 30	0	
11 00	0		2 45	2,6	
11 15	0		3 00	0	
11 30	0		3 15	0	
11 45	0		3 30	0	
12 00	0		3 45	0	
12 15	2,6		4 00	0	
12 30	0		4 15	0	
12 45	0		4 30	0	
1 00	0		4 45	0	
1 15	0		5 00	2,0	Gefüttert
1 30	0		9 00	0	

Versuch 8.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
12h15'	—	Beginn der Beobachtung	4h15'	0,1	
12 30	0,2		4 30	0,1	
12 45	0		4 45	0	
1 00	1,1		5 00	0	
1 15	2,6		5 15	0	
1 30	0		5 30	0,1	
1 45	0		5 45	0,3	
2 00	0,8		6 00	0,1	Gefüttert
2 15	1,3		6 15	0	
2 30	1,2		6 30	0,2	
2 40	0,4	Gefüttert	6 45	0	
3 00	0,2		7 00	0	
3 15	0		7 15	0	
3 30	0		7 30	0	
3 45	0		7 45	0	
4 00	0,1		8 00	0	

Der Eintritt sauren Magensaftes ins Duodenum erscheint nach Ansicht *Boldyreffs* als Hemmungsmoment für die „periodische Sekretion", wobei als aktive Bestandteile des Saftes einerseits die Salzsäure, andererseits irgendwelche noch unbekannte Substanzen in Betracht kommen. Dagegen sollen nach der oben schon zitierten Meinung *Delezennes* und *Frouins* Magensaft und Salzsäure als Erreger der Darmsaftsekretion par distance wirksam sein.

Diese Frage hat für uns nicht nur eine gewisse prinzipielle, sondern auch eine wichtige methodische Bedeutung, da wir in Betracht ziehen müssen, daß einige von den chemischen Stoffen, deren Einfluß auf die Darm-

sekretion zu untersuchen unsere Hauptaufgabe darstellt, wie schon längst im hiesigen Laboratorium festgestellt worden ist, eine erregende Wirkung auf die Magensekretion ausüben. Viele in dieser Richtung angestellten speziellen Versuche zeigten zur Genüge, wie auch nach den Ergebnissen der oben beschriebenen Experimente über den Einfluß der Verdauung in toto auf die Darmsekretion zu erwarten war, daß die in den Magen erfolgende Einführung von Salzsäure in physiologischen Konzentrationen, wie auch von Magensaft zur Steigerung der Darmsaftsekretion aus *Thiry-Vella*scher Fistel keineswegs etwas beitrage, sondern im Gegenteil eher in der Richtung ihrer Abschwächung wirke. Diese Resultate stimmen wiederum mit den Ergebnissen des *Pawlow*schen Laboratoriums, speziell mit den Angaben *Boldyreffs* überein (Versuche 9, 10 und 11).

Versuch 9.

Hund 2. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Mageninhalt	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Mageninhalt	Bemerkungen
6h40'	—	alkalisch	Beginn d. Beob.	9h20'	0	alkalisch	
6 50	0	"		9 30	0,3	"	
7 00	0	"		9 40	0,3	"	
7 10	0	"		9 50	0,3	"	
7 20	0	"		10 00	1,3	"	
7 30	0,2	"		10 10	0	"	Eingeführt in den Magen 200 ccm 0,5 proz. Salzsäure
7 40	1,0	"		10 20	0	Congo positiv	
7 50	1,5	"		10 30	0		
8 00	0,5	"		10 40	0		
8 10	0,1	"		10 50	0		
8 20	0	"		11 00	0,3		
8 30	0,1	"		11 10	0,8	Congo negat.	
8 40	0	"		11 20	0,2	sauer auf Lackmus	
8 50	0	"		11 30	0,1		
9 00	0,2	"		11 40	1,0		
9 10	0	"		11 50	0		

Schepowalnikow stellte, wie bekannt, fest, daß psychische Einwirkungen verschiedenster Art die Darmsaftsekretion nicht beeinflussen. Nun haben wir aber bei der Einverleibung verschiedener Stoffe in unseren Experimenten es stets mit psychischen Einwirkungen depressiven Charakters zu tun. Derartige Kontrollversuche stellten nun eindeutig fest, daß solche Maßnahmen wie das Anbinden des Tieres auf dem Operationstisch, Stich der Spritzennadel u. dgl. keinen bemerkbaren Einfluß auf die Darmsaftsekretion aus *Thiry-Vella*scher Fistel aufwiesen (Versuch 12). Dagegen bei psychischen Reizungen, die eine Appetiterregung hervorrufen können, wie ersichtbar beispielsweise aus dem Versuch 13 (man füttert einen anderen Hund in Gegenwart des Versuchshundes) die „periodische Sekretion" sofort aussetzt, was durch Eintritt des sogenannten psychischen Magensaftes in das Duodenum erklärt wird. Aus derartigen Versuchen folgt die Notwendigkeit, bei verschiedenartigen Untersuchungen in bezug der Darmsekretion, entgegen der Ansicht einiger Autoren (z. B. aus dem *Pawlow*schen Laboratorium), in der Versuchsanordnung dieselben Vorsichtsmaßregeln

Versuch 10.

Hund 2. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Mageninhalt	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Mageninhalt	Bemerkungen
1h45'	0	sauer auf Lackmus		3h55'	0	alkalisch	Eingeführt in den Magen 200 ccm n/10 Salzsäure
1 55	0,8			4 05	0,3	positiv auf Congo	
2 05	0,6			4 15	0,1		
2 15	0	neutral		4 25	0,1		
2 25	0	"		4 35	0,2		
2 35	0	"		4 45	0		
2 45	0,1	alkalisch		4 55	0,4		
2 55	0,5	"		5 05	0,1		
3 05	0,7	"		5 15	0,2		
3 15	0,8	"		5 25	0,7		
3 25	0,4	"		5 35	0		
3 35	0,3	"		5 45	0		
3 45	0,1	"		5 55	0,1		
				6 05	0	neutral	
				6 15	0	"	

Versuch 11.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
9h00'	—		3h15'	0	
9 15	2,4		3 30	0	
9 30	0		3 45	0	
9 45	0		4 00	0	
10 00	0		4 15	0	
10 15	0		4 30	2,0	
10 30	0		4 45	0	Eingeführt in den Magen 200 ccm Magensaft mittels Sonde
10 45	0		5 00	0	
11 00	0		5 15	0	
11 15	0		5 30	0	
11 30	0		5 45	0	
11 45	1,3		6 00	0,6	
12 00	0		6 15	0	
12 15	0		6 30	0	
12 30	0		6 45	0	
12 45	0		7 00	1,5	
1 00	0		7 15	1,5	
1 15	0		7 30	0	
1 30	2,5		7 45	0	
1 45	0		8 00	0	
2 00	0		8 15	0	
2 15	0		8 30	2,6	
2 30	0		8 45	0	
2 45	4,0		9 00	0	
3 00	0				

Versuch 12.

Hund 1. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
11h40′	—	Beginn der Beobachtung	1h05′	?	Auf dem Operationsbrett angebunden von 12h57′ bis 1h05′, also während 8′; starke Unruhe, Stuhl
11 50	0,1		1 10	0,1	
12 00	0,1		1 20	0,1	
12 10	0,1		1 38	0	
12 20	0		1 40	1,3	
12 30	0	Knurren	1 50	1,0	
12 35	0	„	2 00	0,1	
12 45	1,2		2 10	0	
12 55	0,4		2 20	0	
1 00	0,1				

Versuch 13.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
12h00′	0		6h00′	0	
12 15	3,5		6 15	0	
12 30	0		6 30	0	
12 45	0		6 45	1,8	
1 00	0		7 00	1,6	
1 15	0		7 15	0	
1 30	0		7 30	0	
1 45	0		7 45	0	
2 00	0		8 00	0	
2 15	0,5		8 15	0	
2 30	3,7		8 30	0	
2 45	0	Man füttert andere Hunde (2 45 – 5 45)	8 45	1,1	
3 00	0		9 00	0	
3 15	0		9 15	0	
3 30	0		9 30	0	
3 45	0		9 45	0	
4 00	0		10 00	0	
4 15	0		10 15	0,3	
4 30	0		10 30	0	
4 45	0		10 45	0	
5 00	0		11 00	1,4	
5 15	0		11 15	0	
5 30	0		11 30	0	
5 45	0		11 45	0	

anzuwenden, die bei Erforschung der Pankreas und Magensekretion als unerläßliche Bedingungen für Erzielung genauer richtiger Ergebnisse anzusehen sind.

Endlich wurde bei jedem Versuchstier, hauptsächlich um einen Vergleichsmaßstab zu erhalten, die Funktion des Drüsenapparates eines nach *Thiry-Vella* isolierten Darmabschnittes unter Anwendung solcher gut erforschten, sozusagen typischen Darmsekretionserreger wie einerseits Pylocarpin, andererseits lokale mechanische Reizungen, untersucht. Pylo-

carpinum hydrochloricum 0,5 mg auf 1 kg Gewicht ruft eine starke Salivation hervor, beeinflußt aber nicht in bemerkenswerter Weise die Darmsekretion. Dagegen 1 mg dieses Alkaloids auf 1 kg Gewicht ruft eine bedeutendere Absonderung eines dünnflüssigen wässerigen Darmsaftes hervor, welcher bedeutend fermentärmer als der periodische Saft ist (Versuch 14). Atropinum sulphuricum paralysiert jedoch schon in Mengen von 0,1 mg auf 1 kg Gewicht die Einwirkung von 2 mg Pylocarpinum hydrochloricum auf die Darmsekretion vollständig (Versuch 15).

Versuch 14.

Hund 1. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 6 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Puls	Bemerkungen
11h15′	—	etwa 100		1h20′	5,4	180	1h13′, 1h15, 1h20 Stuhl
11 25	1,1	100		1 30	0,8	170	Knurren in Gedärmen
11 35	0,1	100		1 40	1,1	170	Speichelfluß schwäch.
11 40	0	95	Inj. 0,01 Pylocarpin. muriat. subkutan	1 50	0,2	160	
11 45	0,1	—	Beginn der Salivation	2 00	0,2	150	
11 55	0,2		Knurren in Gedärmen	2 10	0,1	145	
12 05	0,4	140	Starke Salivation	2 20	0,2	145	
12 15	1,2	145		2 30	0,2	150	
12 25	0,5	130		2 40	0,7	150	
12 35	0,3	140		2 50	0,9	140	
12 40	0,1	140	Inj. 0,01 Pylocarpin. muriat. subkutan	3 00	0,7	160	Kein Speichel
12 50	0,2	125	Starke Salivation (während 15′ bis 25 ccm Speichel)	3 10	0,1	140	Stuhl
1 00	2,3	140					
1 10	5,0	160					

Fermentgehalt:

„Periodischer Darmsaft“: Lipase $(L^{37^0}_{24\,h})$ = 3,7, Diastase $(d^{37^0}_{1\,h})$ = 64 Einheiten nach *Wohlgemuth*. *„Pylocarpinsaft“:* Lipase $(L^{37^0}_{24\,h})$ = 0,8, Diastase $(d^{37^0}_{1\,h})$ = 16 Einheiten nach *Wohlgemuth*.

Versuch 15. Hund 5. 11 kg Gewicht.

Seitliche Metallfistel: 1. des Duodenums, 6 cm unter dem Duct. pancreat. und 2. des Jejunums, 35 cm unter der ersten Fistel. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 3 Uhr nachmittags.

Zeit	Sekret aus 1. Fistel ccm	Sekret aus 2. Fistel ccm	Bemerkungen	Zeit	Sekret aus 1. Fistel ccm	Sekret aus 2. Fistel ccm	Bemerkungen
11h00′	—	—	Beginn der Beob.	2h00′	30,1	7,0	Inj. 0,01 Pylocarpin. mur. + 0,001 Atropin sulfur. subkutan
11 15	0	0		2 05	10,0	1,0	Starke Salivation
11 30	0	0		2 10	5,0	0	Speichelfluß schwäch.
11 45	0	0	Inj. 0,01 Pylocarpin. muriat. subkutan	2 15	0	0	Kein Speichel
11 50	—	—	Beginn der Sekretion aus beiden Fisteln und der Salivation	2 30	0	0	„

Lokale Reizung der Darmschleimhaut mittels Einführung eines Gummiröhrchens von 5 bis 7 mm Durchmesser und 7 bis 10 cm Länge in die Öffnung der *Thiry-Vella*schen Fistel rief bei unseren Versuchstieren eine wässerige dünnflüssige Abscheidung in Mengen von 4 bis 7 bis 12 ccm pro Stunde hervor. Dieselbe war fast immer mit Blut vermischt und stets bedeutend weniger fermenthaltig als der periodische Darmsaft; dabei reduziert sich der Fermentgehalt um so mehr, je länger die mechanische Reizeinwirkung des Darms währt. Der von uns infolge mechanischer Reizungen beobachtete Sekretionseffekt war bei unseren Tieren stets der gleiche — quantitativ und qualitativ — wie im nüchternen Zustande, so auch auf der Höhe der Verdauung. Nach unseren Beobachtungen übt das Atropin keine irgendwie nennenswerte Einwirkung auf die durch mechanische lokale Darmschleimhautreizungen ausgelöste Darmsekretion aus (Versuche 16 und 17).

Versuch 16.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
12h00'	—	Beginn der Beobachtung	3h45'	0	
12 15	0		4 00	0	
12 30	0		4 15	0	
12 45	0		4 30	0	
1 00	0		4 45	0	
1 20	3,0	Periodischer Darmsaft	5 00	0	
1 30	0	Lipase = 2,0 [1]	5 15	0	
1 45	0	Erepsin = 17,3 [2]	5 30	0	
2 00	0		5 45	1,6	
2 15	0		6 00	0	
2 30	0		6 15	0	Eingeführt Gummiröhrchen, etwa 7 cm lang
2 45	0				
3 00	0		7 15	7,1	„Mechan." Darmsaft
3 15	2,3		8 15	8,0	[1]) Lipase = 0,9 [2]) Erepsin = 9,2
3 30	0				

Wie zu ersehen, stehen die Resultate unserer für eine Reihe strittiger Fragen veranstalteten Versuche völlig in Einklang mit den Ergebnissen des *Pawlow*schen Laboratoriums. Ziehen wir nun die hohe Autorität dieses Laboratoriums in Betracht, welches stets eine physiologische Bedeutung nur solchen Versuchen, die hinsichtlich der

---

[1]) *Lipase:* 0,5 ccm Darmsaft + 10,0 ccm Monobutyrinlösung (1 proz.) + etwa 1,0 Toluol + 38° während 24 Stunden; Titration mit n/50 KOH gegen Phenolphthalein als Indikator.

Kontrollversuch wie oben mit aufgekochtem (5 Minuten auf dem Wasserbade bei 100°) Darmsaft.

[2]) *Erepsin:* 0,5 ccm Darmsaft + 20,0 ccm Wittepeptonlösung (2 proz.) + etwa 1,0 Toluol + 38° während 24 Stunden; Formoltitration nach *Soerensen* (50).

Kontrollversuch wie oben mit aufgekochtem (5 Minuten auf dem Wasserbade bei 100°) Darmsaft.

Versuch 17.

Hund 3. Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen	Zeit	Menge des Darmsaftes ccm	Bemerkungen
2h00'	—	Beginn der Beobachtung	6h45'	2,6	
2 15	0		7 00	0	
2 30	0		7 15	0	
2 45	0		7 30	0	
3 00	0		7 45	0	
3 15	0		8 00	0	
3 30	0		8 15	1,4	
3 45	0		8 30	1,2	
4 00	3,7	Periodischer Darmsaft 1) Lipase = 1,5 2) Erepsin = 11,8	8 45	0	Eingeführt Gummiröhrchen, etwa 10 cm lang
4 15	0		9 45	12,5	Mechanischer Saft Nr. 1
4 30	0		10 05	?	Röhrchen umgetauscht (7 cm lang)
4 45	0				
5 00	0		12 05	16,5	Mechanischer Saft Nr. 2
5 15	0				
5 30	0				
5 45	0				
6 00	0				
6 15	0				
6 30	0				

„Mechan." Saft	Lipase[1]	Erepsin[2]
Nr. 1 . . .	– 0,7	– 4,4
„ 2 . . .	– 0,45	– 4,4

Methodik absolut einwandfrei sind, zuzuschreiben pflegt, so konnten wir uns mit vollem Vertrauen zu unseren Versuchstieren verhalten, mit anderen Worten, wir sind berechtigt, die Schlußfolgerung zu ziehen, daß wir es mit völlig gesunden Organen — Darmschleimhaut — vollkommen gesunder Tiere als Untersuchungsobjekte zu tun hatten.

Bei der Erklärung des auffallenden Auseinandergehens unserer Ergebnisse, sowie der Resultate des *Pawlow*schen Laboratoriums mit denen *Delezennes* und *Frouins* in der Frage über die Einwirkung der Verdauung in toto, der Salzsäure und des Magensaftes auf die Darmsekretion par distance schließen wir uns gänzlich der Ansicht *Sawitschs* an, nämlich daß es sich bei den Versuchen genannter Autoren um eine sogenannte „paralytische Sekretion", infolge zugelassener Durchtrennung eines großen Teiles der Intestinalnerven während Auflegung der Fisteln nach *Thiry*, handelt. Für diese Annahme spricht: 1. die

[1]) *Lipase:* 0,5 ccm Darmsaft + 10,0 ccm Monobutyrinlösung (1 proz.) + etwa 1,0 Toluol + 38° während 24 Stunden; Titration mit n/50 KOH gegen Phenolphthalein als Indikator.

Kontrollversuch wie oben mit aufgekochtem (5 Minuten auf dem Wasserbade bei 100°) Darmsaft.

[2]) *Erepsin:* 0,5 ccm Darmsaft + 20,0 ccm Wittepeptonlösung (2 proz.) + etwa 1,0 Toluol + 38° während 24 Stunden; Formoltitration nach *Soerensen* (50).

Kontrollversuch wie oben mit aufgekochtem (5 Minuten auf dem Wasserbade bei 100°) Darmsaft.

von ihnen beschriebene, sofort nach der Operation auftretende spontane, mehrere Wochen andauernde, mit der Zeit sich allmählich abschwächende kontinuierliche Darmsaftsekretion aus der Fistelöffnung, und 2. die Verstärkung derselben bei Nahrungsaufnahme. Dieses Erscheinungsbild entspricht in der Tat völlig den Beobachtungen *Molnàrs* an einem Hunde mit *Thiry-Vella*scher Fistel, dem die betreffenden mesenterialen Nerven speziell durchgetrennt wurden, und ebenso den Ergebnissen kürzlich beschriebener Untersuchung *Sawitschs* (51) über die Funktion der Darmdrüsen der *Thiry-Vella*schen Fistel an Hunden, bei denen eine Durchtrennung des Pl. coeliacus, Gangl. mesenterial sup. und der Nn. splanchnici ausgeführt wurde.

Literatur.

1) *R. Krimberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 412, 1906. — 2) *Derselbe*, a) „Zur Frage über den Mechanismus der Magensekretion". Charkow 1915; b) „Die Hormone usw.". Charkow 1918. — 3) *W. Boldyreff*, a) Diss. St. Petersburg 1904; b) Ergebnisse der Physiologie, Jahrg. 11, S. 185, 1911; c) Russki Wratsch 1914, Nr. 45—49. — 4) *Leper*, Diss. St. Petersburg 1904. — 5) *W. A. Brynk*, Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Path. des Stoffwechsels **6**, Nr. 1, S. 2—7, 1911. — 6) *Molnàr*, Deutsch. med. Wochenschr. 1909, S. 1384. — 7) *B. P. Babkin*, „Die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen". Berlin 1914, S. 390. — 8) *Sawitsch*, Diss. St. Petersburg 1904. — 9) *U. Lombroso*, Atti del Congresso di Pathologia in Firenze 1903, zitiert nach *L. J. Groen*. — 10) *B. C. P. Jansen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 400, 1910. — 11) *L. J. Groen*, ebendaselbst **89**, 91, 1914. — 12) *E. S. London* und *N. Dobrowalskaja*, ebendaselbst **68**, 374, 1910; *E. S. London*, ebendaselbst **89**, 511, 1914. — 13) *D. L. Glinski*, Diss. St. Petersburg 1891. — 14) *N. P. Schepowalnikow*, Diss. St. Petersburg 1899. — 15) *F. Pregl*, Pflügers Arch. **111**, 359, 1895. — 16) *J. Nagano*, Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Medizin u. Chirurgie **9**, 393, 1902; Pflügers Arch. **90**, 389, 1902. — 17) *W. Busch*, Virchows Arch. **14**, 140, 1858. — 18) *L. Thiry*, Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss. **50**, Abt. I, S. 77, 1864. — 19) Zitiert nach *Th. Brugsch*, Oppenheimers Handbuch der Biochemie **3**, H. 1, S. 107, 1910. — 20) *Gumilewsky*, Pflügers Arch. **39**, 556, 1886. — 21) *Hamburger* und *Hekma*, Journ. d. Physiol. et de Pathol. génér. **4**, 805, 1902. — 22) *A. Frouin*, C. r. d. l. Soc. d. Biol. **58**, 653, 1905. — 23) *C. Delezenne* und *A. Frouin*, ebendaselbst **56**, 319, 1904. — 24) *A. Frouin*, ebendaselbst **56**, 461, 1904. — 25) *W. M. Bayliss* und *E. H. Starling*, a) Journ. of Physiol. **28**, 325, 1902; b) Ergebnisse der Physiol., Jahrg. V, S. 664—697, 1906. — 26) *A. Moreau*, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1868, S. 209. — 27) *A. Hanau*, Zeitschr. f. Biol. **22**, 196, 1886. — 28) *Lafayette B. Mendel*, Pflügers Arch. **63**, 425, 1896. — 29) *Falloise*, Arch. intern. d. physiol. **1**, 261, 1904. — 30) *Sawitsch* und *Soschestwenskij*, Setschenoffs russ. phys. Journ. **3**, H. 1—3, S. 43—44, 1921; *W. W. Sawitsch*, ebendaselbst **2**, H. 1—3, S. 91, 1919. — 31) *Roger* und *Garnier*, Sem. Med. 1908, Nr. 1, S. 179. — 32) *F. Bottazzi*, Arch. di physiologia **1**, 413—472, 1904; zitiert nach *E. Zunz*, Arbeitsmethod. **3**, H. 1, S. 208. — 33) *F. Bottazzi* und *L. Gabrieli*, Arch. intern. d. physiol. **3**, 156—167, 1905. — 34) *Th. Mironescu*, Intern. Beitr. z. Path. u. Therap. der Ernährungsstörungen **1**, 194, 1910. — 35) *G. Hirata*, ebendaselbst **2**, 240, 1911. — 36) *L. Popielski*, Gazeta

lekarska 1910, Nr. 34—37. — 37) *A. Frouin*, C. r. d. l. Soc. d. Biol. **58**, 702, 1905. — 38) Zitiert nach *K. Matsuoka*, diese Zeitschr. **136**, 378, 1923. — 39) *E. H. Starling*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **7**, 67, 1913. — 40) *Davidsohn* und *Friedmann*, Berl. klin. Wochenschr. 1909, S. 1120. — 41) *Heilner*, zitiert nach *E. Seligmann*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., Ergänzungsband, S. 287, 1913. — 42) *Biedl* und *Kraus*, Wien. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 11. — 43) *Arthus*, Arch. intern. de physiol. **9**, 179, 1910. — 44) *Nolf*, ebendaselbst **9**, 1910. — 45) *Calvary*, Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 13. — 46) *Schittenhelm* und *Weichardt*, ebendaselbst 1910, Nr. 34; 1911, Nr. 16; Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1910, Nr. 14; Deutsch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 19. — 47) *L. Popielski*, Pflügers Arch. **120**, 476, 1907; **128**, 203, 1909. — 48) *R. Krimberg*, Hoppe-Seyler-Tierfelders Handb. d. physiologisch-chemischen Analyse, S. 758—761, 1909; Handb. d. biolog. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 7, S. 325, 1922. — 49) *Derselbe*, Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Muskeln. Diss. Moskau 1907. — 50) *J. Wohlgemuth*, Grundriß der Fermentmethoden. Berlin 1913, S. 229. — 51) *Sawitsch*, Setschenoffs russ. physiol. Journ. **3**, H. 1/5, S. 13—14, 1921 (refer. Ber. d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **14**, 162).

Weitere Untersuchungen über die Giftempfindlichkeit von Lipasen verschiedener Herkunft.

Von

P. Rona und H. Petow.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 19. Januar 1924.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

I. In früheren Untersuchungen konnte ein stark ausgeprägtes spezifisches Verhalten von Fermenten, im besonderen der Lipasen verschiedener Herkunft gegen verschiedene Gifte nachgewiesen werden. So wurde gefunden[1]), daß z. B. Serumlipase (im Serum von Menschen) bereits von 0,01 mg Chinin hydrochlor. (in 50 ccm Gesamtvolumen) in ihrer Wirksamkeit auf Tributyrin gehemmt wird, während Leberlipase (im wässerigen Leberextrakt vom Menschen) selbst gegen 10 mg Chinin (unter denselben Bedingungen) vollkommen unempfindlich ist. Gegen Atoxyl erwies sich Pankreaslipase vom Menschen und vom Hunde (wässerige Organextrakte wie auch Fistelsaft) ganz unempfindlich, während die Leberlipase (vom Menschen und von der Katze) sehr empfindlich ist[2]). Ganz unempfindlich gegen Chinin war auch die Nierenlipase menschlicher Herkunft[3]). Die genaue Prüfung der Lipasen anderer Organe (Lunge, Milz, Nebenniere) ist noch im Gange.

Aber nicht nur Fermente verschiedener Organe, sondern die gleichen Organe verschiedener Tierarten verhielten sich gegen ein und dasselbe Gift verschieden. So wurden Serumlipasen einer Reihe von Tierarten (Kaninchen, Katze, Ratte, Maus, Meerschweinchen) ziemlich resistent bis unempfindlich gegen Chinin gefunden[4]).

Die nächstliegende Frage, ob diese strenge Spezifität in der Empfindlichkeit gegen das Gift dem Ferment als solchem oder etwa der Umgebung, in der das Ferment sich befindet, zuzuschreiben ist, suchten wir zunächst so zu entscheiden, daß wir die verschiedenen Fermentlösungen (Serum oder Organextrakt) miteinander mischten und zusahen, wie solche Gemische sich gegen das Gift verhielten. Es bestand die Möglichkeit, daß mit der zu der ersten zugefügten zweiten Ferment-

---

[1]) *P. Rona* und *R. Pavlovic*, diese Zeitschr. **130**, 225, 1922.
[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **134**, 108, 1922.
[3]) *P. Rona* und *H. E. Haas*, ebendaselbst **141**, 222, 1923.
[4]) *P. Rona* und *D. Reinicke*, ebendaselbst **118**, 213, 1921.

lösung derjenige „Zustand“ des Ferments entsteht, der ihn für das Gift empfänglich oder widerstandfähig machen würde. Das Verhalten des einen Ferments würde, falls diese Annahme zu Recht besteht, in dem veränderten Milieu dasjenige des anderen Ferments gegen das Gift bestimmen. Die Untersuchungen ergaben, daß dies nicht der Fall war, sondern daß jede Fermentart ihre Eigenart dem Gifte gegenüber auch im Gemisch behielt. Mischt man z. B.[1]) Menschen- und Tierserum miteinander, so war keinerlei „Schutzwirkung“ des letzteren gegen das Chinin zu beobachten, sondern die Lipasen der betreffenden Sera wirkten ungestört nebeneinander und addierten ihre Wirkungen. Wurden Serumlipase (Serum) mit Leberlipase (wässeriger Leberextrakt) oder nur Nierenlipase (wässeriger Nierenextrakt) miteinander vermischt[2]), so wurde die Empfindlichkeit bzw. die Resistenz gegen das Gift nicht von einer auf die andere Fermentart übertragen.

Diese Versuche sprachen also dafür, daß die Giftempfindlichkeit der in Frage kommenden Fermente nicht von den die Fermentwirkung begleitenden Faktoren der Umgebung, sondern von der „Natur“ (chemische und physikalische Konstitution) des Ferments selbst abhängt.

II. Ein anderer Weg zur Lösung der Frage, wieweit die Fermente als solche und wieweit die Umgebung das Verhalten gegen die Gifte bestimmt, ist, die Fermente in möglichst reinem Zustande darzustellen. Zur Reindarstellung der Leber- und der Pankreaslipase standen uns die Vorschriften von *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Leitz*[3]) zur Verfügung. Bei der Reinigung der Serumlipase konnten wir die Beobachtung verwerten, daß bei der fraktionierten Ausfällung der Globuline die Lipase mit bestimmten Globulinfraktionen mitgerissen wird und dann mit diesen Fraktionen mit Glycerin in Lösung gebracht werden konnte[4]). Diese Fraktionen waren bei $^4/_{10}$ bis $^6/_{10}$ Ammonsulfatsättigung erhalten, und zwar war die Hauptmenge der Lipase beim Pferdeserum bei $^6/_{10}$ Sättigung gewonnen, während beim Menschenserum ein Unterschied zwischen $^4/_{10}$ und $^6/_{10}$-Sättigung nicht zu beobachten war. Bei $^3/_{10}$-Sättigung war die ganze Lipase im Filtrat, während bei Sättigungen über $^6/_{10}$ im Filtrat nichts von der Lipase vorhanden war. Die Globulinniederschläge wurden durch Zentrifugieren von der darüber stehenden Flüssigkeit möglichst gründlich befreit, dann in Glycerin aufgenommen. In Arbeit kamen meist 30 bis 50 ccm Serum; die Globulinfraktionen wurden in 5 bis 10 ccm Glycerin gelöst und ihr Lipasetiter nach *R. Will-*

[1]) *P. Rona* und *D. Reinicke*, l. c.

[2]) *P. Rona* und *R. Pavlovic*, l. c.; *P. Rona* und *E. H. Haas*, l. c.

[3]) *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 132, 1923.

[4]) Bei diesen Versuchen hat uns Herr Dr. *Schreiber* wertvolle Hilfe geleistet.

stätter und *Fr. Memmen*[1]) bestimmt. — Ist die Reinigung des Ferments bei diesem Verfahren nicht so weitgehend wie bei der *Willstätter*schen (da eine Elution des an Tonerde adsorbierten Ferments wohl infolge der geringen Fermentkonzentration zu keinem Erfolg führte), so haben wir dennoch auch hier ein von Begleitstoffen weitgehend befreites Ferment zu den Versuchen benutzt.

1. Betrachten wir zuerst die Versuche mit den Glycerinlösungen der Globulinfraktionen der betreffenden Serumarten, so sehen wir, daß die bei Anwendung des ursprünglichen Serums behobenen Befunde in bezug auf das Verhalten der Lipase auch bei diesen „Serumfraktionen" ihre Geltung behalten.

In allen Versuchen dieser Mitteilung wurde die betreffende Fermentlösung (meist 1 ccm) mit 2 ccm Pufferlösung (m/3 primäres Phosphat 1 zu m/3 sekundäres Phosphat 8, $p_H = 7,7$), dann mit 1 ccm der Giftlösung (1proz. Chinin hydrchlor. bzw. 1proz. Atoxyllösung bzw. destilliertes Wasser) versetzt, die Mischung 1 Stunde stehengelassen und dann 50 ccm der gesättigten Tributyrinlösung zugefügt. Die Spaltung wurde mit der stalagmometrischen Methode verfolgt.

Wie die ohne jede Vorbehandlung angewandte Menschenserumlipase, so war auch die durch Fraktionierung des Serums gewonnene (in den Versuchen mit „Serumfraktion" bezeichnet) chininempfindlich, während die Pferdeserumlipase sich sowohl im ursprünglichen Serum, wie auch in den Glycerinlösungen der Fraktionen sowohl gegen Chinin als auch gegen Atoxyl resistent erwies.

Dies zeigen die folgenden Versuche[2]).

Versuch 9 (Abb. 1). Menschenserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,3, verdünnt 1 : 2). Chinin. hydrochlor. in Kolben 2: 5 mg; Kolben 3:

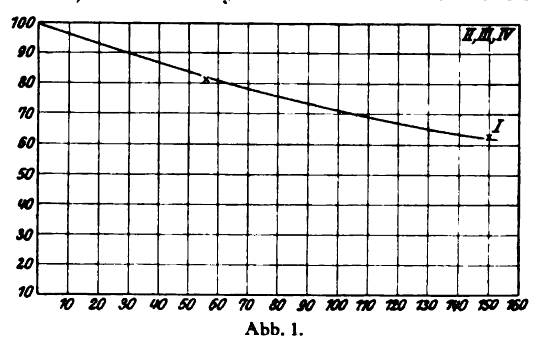


Abb. 1.

2,5 mg; Kolben 4: 1,25 mg; Kolben 1: Kontrolle. Die Konstanten (berechnet nach der monomolekularen Reaktion × 10^4 waren in den Kolben 1: 14,8, in den Kolben 2 bis 4: 0.

---

[1]) *R. Willstätter* u. *Fr. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **129**, 1, 1923.

[2]) In den Abbildungen sind die Zeiten (Minuten) auf der Abszisse, die Prozente Tributyrin auf der Ordinate aufgetragen. Die Kolben 1, 2 usw. sind in den Abbildungen mit I, II usw. bezeichnet.

Versuch 10 (Abb. 2). Menschenserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,3, verdünnt 1 : 2). Chinin. hydrochlor. in Kolben 2: 2,5 mg; in Kolben 3: 1,25 mg; in Kolben 4: 0,61 mg; 1. Kontrolle.

$k.10^4$ in Kolben 1: 16,5; in Kolben 4: 6,4; in Kolben 2 und 3: 0.

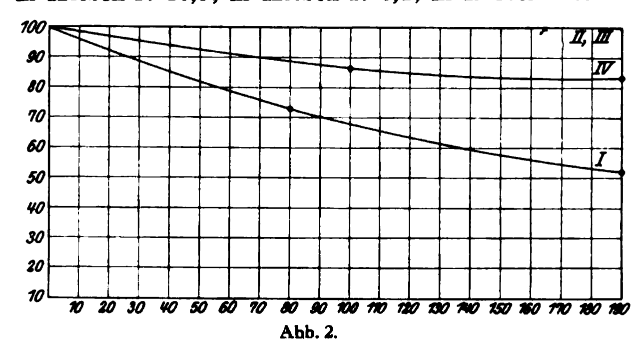


Abb. 2.

Versuch 12 (Abb. 3). Pferdeserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 2,4, angewandt in einer Verdünnung 1 : 5). Chinin. hydrochlor. in Kolben 2: 5 mg; in Kolben 3: 2,5 mg; Kolben 1: Kontrolle.

$k.10^4$ in allen drei Kolben: 12,6.

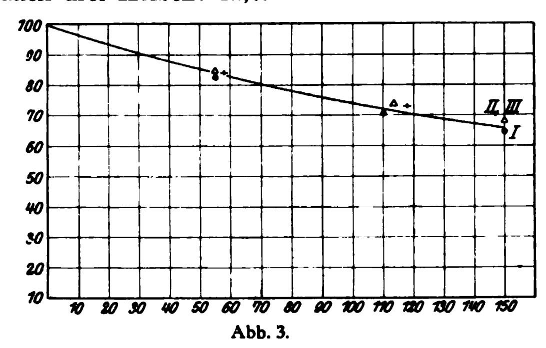


Abb. 3.

Versuch 7 (Abb. 4). Pferdeserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 1,0, angewandt in Verdünnung 1 : 2). Chinin. hydrochlor. in Kolben 2: 10 mg; in Kolben 3: 5 mg; in Kolben 4: 2,5 mg; in Kolben 1: Kontrolle.

$k.10^4$ in Kolben 1: 34,5; in Kolben 2, 3 und 4: 25,7.

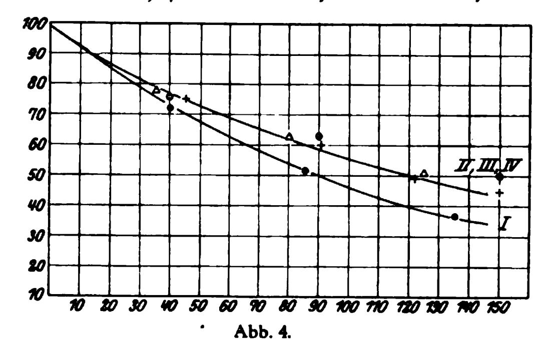


Abb. 4.

Versuch 13 (Abb. 5). Pferdeserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 2,4, angewandt in Verdünnung 1 : 4). Atoxyl in Kolben 2: 5 mg; in Kolben 3: 2,5 mg; in Kolben 4: 1,25 mg; in Kolben 1: Kontrolle.

$k.10^4$ in allen fünf Kolben: 30,3.

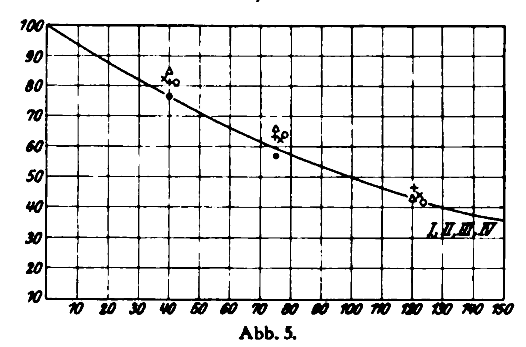


Abb. 5.

Vereinigt man die Serumfraktionen vom Menschen und vom Pferde — wie in den folgenden drei Versuchen — und vergiftet man das Gemisch mit Chinin, so wird nur die Menschenlipase abgetötet, die Pferdelipase behält ihre ursprüngliche Wirksamkeit.

Die Versuche (Nr. 25 und 24) wurden so angestellt, daß zunächst die Wirksamkeit von 1 Teil Menschenlipase und 1 Teil Pferdeserumlipase, dann die kombinierte Wirkung von je einem halben Teil Menschen- + Pferdelipase ohne Gift geprüft wurde. Die Fermentstärken wurden so abgestimmt, daß alle drei Kurven (ganz oder angenähert) zusammenfielen. Dann wurde (in drei weiteren Versuchsreihen) die Wirkung von ½ Teil Menschenlipase ohne Chinin, von ½ Teil Pferdelipase ohne Chinin und endlich von ½ Teil Menschen- + ½ Teil Pferdelipase mit Chinin geprüft. In einer letzten Versuchsreihe wurde die Wirkung derselben Chinindosis auf ½ Teil Menschenlipase geprüft. In Versuch Nr. 23 wurden nur die vier letzten Versuchsreihen ausgeführt.

Versuch 25. (Abb. 6.) Kombination von Menschenserumlipase und Pferdeserumlipase. Kolben 1: Menschenserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,4, angewandt in Verdünnung 1 : 3) 3 ccm. Kolben 2: Pferdeserum-

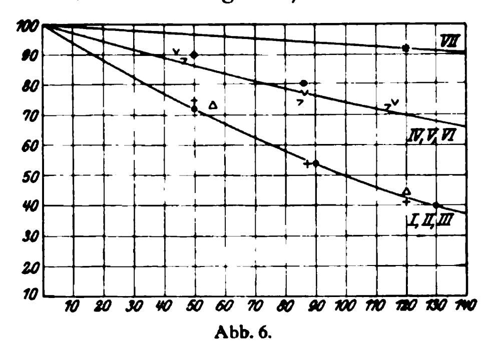


Abb. 6.

fraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 1,25, angewandt in Verdünnung 1 : 5) 2 ccm. Kolben 3: Menschenserumfraktion 1,5 ccm + Pferdeserumfraktion 1,0 ccm. Kolben 4: Menschenserumfraktion 1,5 ccm + Pferdeserumfraktion 1,0 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor. Kolben 5: Menschenserumfraktion 1,5 ccm. Kolben 6: Pferdeserumfraktion 1,0 ccm. Kolben 7: Menschenserumfraktion 1,5 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor.

$k.10^4$ in Kolben 1 bis 3: 30,2; in Kolben 4 bis 6: 12,2; in Kolben 7: 0.

Versuch 24 (Abb. 7). Kombination von Menschenserumlipase und Pferdeserumlipase. Kolben 1: Menschenserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,4) 2 ccm. Kolben 2: Pferdeserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 1,11, angewandt in Verdünnung 1: 3) 2 ccm. Kolben 3: Menschenserumfraktion 1 ccm + Pferdeserumfraktion 1 ccm. Kolben 4: Menschenserumfraktion 1 ccm + Pferdeserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor. Kolben 5: Menschenserumfraktion 1 ccm. Kolben 6: Pferdeserumfraktion 1 ccm. Kolben 7: Menschenserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor.

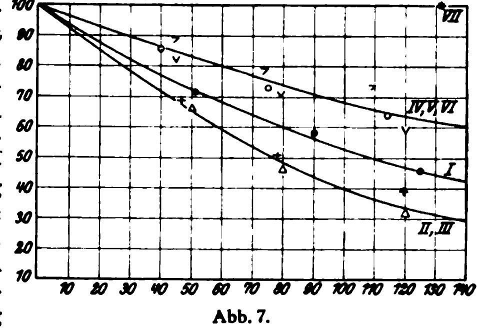


Abb. 7.

$k.10^4$. Kolben 1: 27,8; Kolben 2 und 3: 38,0; Kolben 4 bis 6: 16,4; Kolben 7: 0.

Versuch 23 (Abb. 8). Kombination von Menschenserumlipase und Pferdeserumlipase. Kolben 1: Menschenserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,15) 1 ccm. Kolben 2: Pferdeserumfraktion (Lipaseeinheiten in 1 ccm

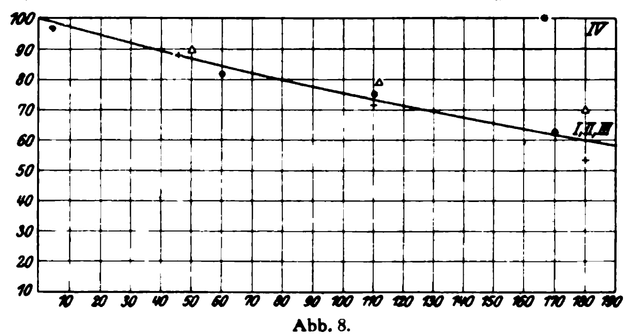


Abb. 8.

0,7, angewandt in Verdünnung 1 : 4) 1 ccm. Kolben 3: Menschenserumfraktion 1 ccm + Pferdeserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor. Kolben 4: Menschenserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor.

$k.10^4$. Kolben 1 bis 3: 12,4; Kolben 4: 0.

2. In den folgenden Versuchen haben wir Menschenserumlipase mit Leberlipase vom Schweine in der gleichen Weise wie oben die beiden Serumfraktionen kombiniert. Benutzt wurden zu diesen Versuchen die bereits in den obigen Versuchen verwendeten „Menschenserumfraktionen", dann Elutionen von Schweineleberlipase, die genau

nach den Vorschriften von *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Leitz* aus den vorher nach den Angaben dieser Autoren hergestellten Trockenpulvern der Organe mittels Glycerinauszug und nachheriger Adsorption an Tonerdehydrat [nach der Methode B hergestellt[1])] gewonnen wurden. Die Lipase der „Schweineleberelution" ist resistent gegen Chinin, und sie behält diese Eigenschaft auch in Kombination mit der „Serumfraktion" in Glycerin.

Versuch 32. (Abb. 9.) Kolben 1: Serumfraktion vom Mensch (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,5, angewandt in Verdünnung 1 : 2) 2 ccm. Kolben 2: „Leberelution" vom Schwein (Lipaseeinheiten in 1 ccm 6,1, angewandt in Verdünnung 1 : 8) 1 ccm. Kolben 3: Menschenserumfraktion 1 ccm + „Leberelution" 0,5 ccm. Kolben 4: Menschenserumfraktion 1 ccm + Leberelution 0,5 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor. Kolben 5: Menschenserumfraktion 1 ccm. Kolben 6: Leberelution 0,5. Kolben 7: Menschenserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor.

$k \cdot 10^4$. Kolben 1 bis 3: 37,0; Kolben 4 bis 6: 21,5; Kolben 7: 0.

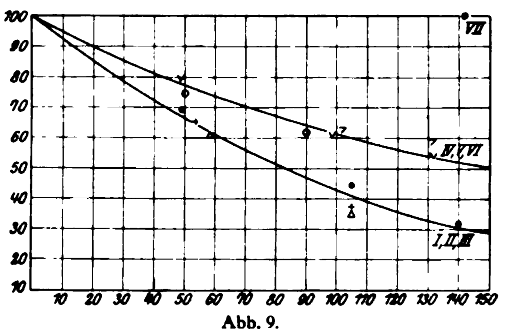


Abb. 9.

Versuch 31 (Abb. 10). Kolben 1: Serumfraktion vom Mensch (Lipaseeinheiten in 1 ccm 0,5, Verdünnung 1 : 2) 2 ccm. Kolben 2: „Leberelution" vom Schwein (Lipaseeinheiten in 1 ccm 6,1, Verdünnung 1 : 6) 1 ccm. Kolben 3: Menschenserumfraktion 1 ccm + Leberelution 0,5. Kolben 4: Menschenserumfraktion 1 ccm + Leberelution 0,5 + Chinin. hydrochlor. 2 mg. Kolben 5: Menschenserumfraktion 1 ccm. Kolben 6: Leberelution 0,5. Kolben 7: Menschenserumfraktion 1 ccm + 2 mg Chinin. hydrochlor.

$k \cdot 10^4$. Kolben 1 und 3: 34,6; Kolben 2: 28,6; Kolben 4 bis 6: 16,6; Kolben 7: 0.

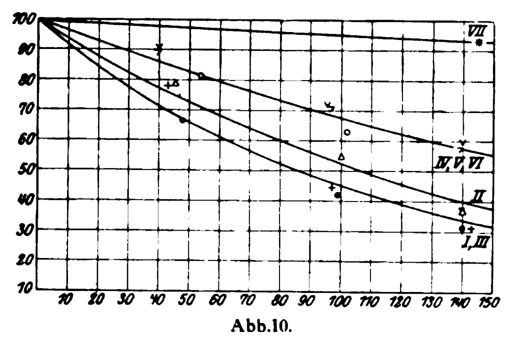


Abb. 10.

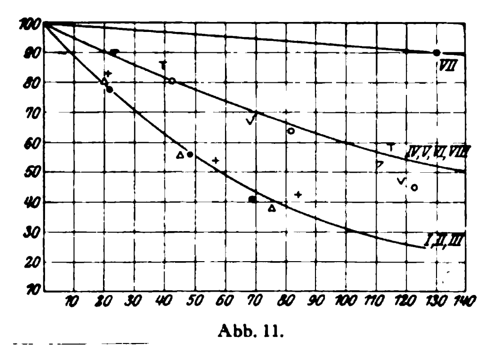


Abb. 11.

[1]) Vgl. l. c., S. 161.

3. In den folgenden zwei Versuchen wurden „Elutionen" aus Pankreas vom Schweine [aus dem getrockneten und entfetteten Organ mittels Adsorption des Glycerinauszuges an Al_2O_3 und nachheriger Elution[1]) gewonnen] und solche aus Leber vom Schweine (ebenso dargestellt) kombiniert und der Wirkung von Atoxyl ausgesetzt. Die Pankreaslipase ist gegen Atoxyl (fast) ganz unempfindlich, die Leberlipase stark empfindlich. So sehen wir auch in unseren Versuchen, daß bei der Kombination der beiden Fermente das Atoxyl nur die eine Lipaseart hemmt, die andere nicht beeinflußt.

Versuch 35. (Abb. 11.) Kolben 1: Pankreaselution (Lipaseeinheiten nach 300facher Verdünnung in 1 ccm 0,47) 2 ccm. Kolben 2: Leberelution (Lipaseeinheiten in 1 ccm 6,1, angewandt in elffacher Verdünnung) 2 ccm. Kolben 3: Pankreaselution 1 ccm + Leberelution 1 ccm. Kolben 4: Pankreaselution 1 ccm + Leberelution 1 ccm + 5 mg Atoxyl. Kolben 5: Pankreaselution 1 ccm. Kolben 6: Leberelution 1 ccm. Kolben 7: Leberelution 1 ccm + 5 mg Atoxyl. Kolben 8: Pankreaselution 1 ccm + 5 mg Atoxyl.

$k.10^4$. Kolben 1 bis 3: 50,0; Kolben 4, 5, 6, 8: 22,0; Kolben 7: 0.

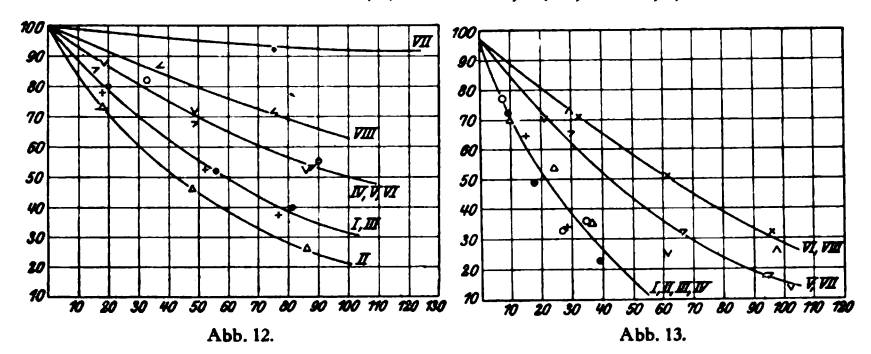


Abb. 12. Abb. 13.

Versuch 34 (Abb. 12). Anordnung wie im Versuch 35.

$k.10_4$. Kolben 1 und 3: 50,6; Kolben 2: 70,0; Kolben 4, 5, 6: 30,5; Kolben 8: 20,5; Kolben 7: 0.

4. In einer letzten Versuchsreihe mischten wir Lipasen von dreierlei Herkunft — Leber, Pankreas vom Schweine, Serum vom Menschen — und prüften dieses Gemisch einmal mit Atoxyl, einmal mit Chinin. Die Lipase aus Schweinepankreas ist sowohl gegen Atoxyl als auch gegen Chinin unempfindlich[2]), die aus Schweineleber gegen Chinin unempfindlich, gegen Atoxyl empfindlich, während die Lipase des menschlichen Serums sowohl gegen Chinin als auch gegen Atoxyl

---

[1]) Vgl. *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Seitz*, l. c., S. 171.

[2]) Während Hunde- und Menschenpankreas nach früheren Untersuchungen eine chininempfindliche Lipase enthält. Allerdings fanden wir jetzt an nach *Willstätter* dargestellter Pankreaslipase vom Menschen eine viel geringere Empfindlichkeit gegen das Gift als seinerzeit bei den wässerigen Organauszügen.

empfindlich ist. Mischt man also gleiche Teile der drei Lipasen und behandelt man das Gemisch einmal mit Chinin, einmal mit Atoxyl, so müssen im ersten Falle zwei Drittel der ursprünglichen Wirkung (die kombinierten Wirkungen der Pankreas- und der Leberlipasen), im zweiten Falle nur ein Drittel der Wirkung ohne Gift (nur die Wirkung der Pankreaslipase) übrig bleiben. Das ist, wie der folgende Versuch zeigt, auch der Fall.

Angewandt wurden zu dem Versuch (39; Abb. 13) die oben angewandten Elutionen aus dem Pankreas und der Leber vom Schwein, ferner die entsprechende Serumfraktion vom Menschen in Glycerin.

Kolben 1: Menschenserumfraktion 3 ccm. Kolben 2: Schweinepankreaselution 3 ccm. Kolben 3: Schweineleberelution 3 ccm. Kolben 4: Menschenserumfraktion, Schweinepankreaselution, Schweineleberelution je 1 ccm. Kolben 5: Menschenserumfraktion, Schweinepankreaselution, Schweineleberelution je 1 ccm + 5 mg Chinin. hydrochlor. Kolben 6: Menschenserumfraktion, Schweinepankreaselution, Schweineleberelution je 1 ccm + 5 mg Atoxyl. Kolben 7: Schweineleberelution + Schweinepankreaselution je 1 ccm. Kolben 8: Schweinepankreaselution 1 ccm.

$k \cdot 10^4$. Kolben 1 bis 4: 143,0; Kolben 5 und 7: 70,2; Kolben 6 und 8: 48,4.

Zusammenfassung.

Das in vorangegangenen Untersuchungen festgestellte spezifische Verhalten der Lipasen verschiedener Herkunft läßt sich auch an weitgehend gereinigten Fermenten wiederfinden.

Die Giftempfindlichkeit bzw. die Resistenz gegen die angewandten Gifte Chinin und Atoxyl war bei nach *Willstätter* hergestellten Lipasen aus Schweinepankreas und Schweineleber, wie bei durch fraktionierte Fällung gereinigter Serumlipase dieselbe wie bei den wässerigen Auszügen der betreffenden Organe bzw. vom ursprünglichen Serum.

Mischt man die so gereinigten Lipasearten verschiedener Herkunft und setzt man das Gemisch der Giftwirkung aus, so behält jede Fermentart ihre Eigenart dem Gifte gegenüber auch im Gemisch bei, und man ist so in der Lage, ein Gemisch von Fermenten auf ihre Komponenten zu prüfen. So erhält man in einem Gemisch von gleichen Teilen Menschenserum-, Schweinepankreas-, Schweineleberlipase bei Einwirkung von Chinin zwei Drittel der Gesamtfermentwirkung (übrigbleibende Wirkung von Pankreas- und Leberlipase), bei Einwirkung von Atoxyl nur ein Drittel der Gesamtwirkung (übrig bleibende Wirkung der Pankreaslipase).

Der „Grundumsatz“ eine relative Größe.

Von

Egon Helmreich.

(Aus der Universitätskinderklinik in Wien.)

(Eingegangen am 21. Januar 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wenn man den Grundumsatz bestimmt, will man ein Bild gewinnen über die Energiemenge, welche ein Organismus verbraucht, um seine Funktionstüchtigkeit und seinen Bestand an lebendem Protoplasma ungeschmälert zu erhalten.

Die Kosten einer äußeren Arbeit sind darin nicht enthalten. Zur Ermittlung des Grundumsatzes bringt man den Körper in den Zustand der Muskelruhe und der Nüchternheit, um die zwei bei weitem ausgiebigsten Umsatzsteigerungen auszuschließen. Nur in einem Teil der Gewebe wird man den Kraftwechsel der ruhenden Zelle erfassen; die Tätigkeit mancher Organe, z. B. des Herzens und der Atemmuskeln, ruht nie ganz, und sie ist im Grundumsatz inbegriffen. Verwickelter sind die Verhältnisse bei der Verdauung: im Zustand der Nüchternheit, 12 bis 15 Stunden nach der Nahrungsaufnahme, hat die Sekretion und Resorption, sowie die Bewegung im Dünndarm im wesentlichen aufgehört; der Dickdarm ist aber noch gefüllt. Auch die Verdauung jenseits des Darmes, z. B. in der Leber, hält länger an als die Dünndarmtätigkeit und man müßte, um jeden Einfluß der Nahrungsaufnahme auf den Energieumsatz auszuschließen, zu einem so späten Zeitpunkt untersuchen, wo schon der „Hungerstoffwechsel“ sich geltend zu machen beginnt. Der Anteil der Dickdarmtätigkeit am Gesamtkraftwechsel ist sicher nur sehr gering zu bewerten, der Einfluß der postintestinalen Verdauung ist aber nicht leicht abzuschätzen.

Man war der Meinung, daß der Grundumsatz für jeden Organismus ein ziemlich feststehender Wert sei, welcher im wesentlichen von der Größe oder der Masse des Körpers abhängt und von der individuellen Aktivität des Stoffwechsels, welche durch den Zustand der innersekretorischen Drüsen gegeben ist; ein Fixum, dessen Schwankungen man allein der verschiedenen Sorgfalt bei seiner Ermittlung zuschreiben wollte. Eine schöne Bestätigung dieser Annahme schien damit gegeben, daß es sich in langfristigen Untersuchungsreihen zeigte, daß bei demselben Menschen die Größe des Grundumsatzes auch für längere Zeitstrecken in engen Grenzen konstant gefunden wurde. Es ist dies nicht verwunderlich, da man doch bei solchen Untersuchungen auf die Einhaltung gleichbleibender Verhältnisse Bedacht nimmt und da auch bei nicht absichtlicher Regelung ein Erwachsener spontan seine festgelegten Lebensgewohnheiten beibehält.

Pflüger stellte dann, um die Unabhängigkeit und die Konstanz des Grundumsatzes auch dem Angebot an Nahrungsstoffen gegenüber zu

betonen, das Gesetz auf, daß die Zelle den Verbrauch bestimme und auch durch einen Überschuß an Nahrungszufuhr zu einer Erhöhung des Grundumsatzes nicht gezwungen werden könne. Er wendete sich damit wohl hauptsächlich gegen die Lehre von der Luxuskonsumption. Die klinische Beobachtung hatte sie postuliert für solche Fälle, wo bei sehr reichlicher Ernährung (und guter Ausnutzung im Darm) ein Mensch oder Tier an Gewicht nicht oder nicht entsprechend zunahm. Für solche Fälle nahm man an, daß die über den Erhaltungsumsatz zugeführte Nahrung nicht gespeichert, sondern gleich verbrannt werde; in welcher Weise sich der erhöhte Energieverbrauch auswirke, war unklar. Der Begriff der Luxuskonsumption wurde schließlich von den meisten abgelehnt. Zu einigen Ehren kam sie wieder durch *Grafes* Untersuchungen, der zeigen konnte, daß bei forcierter Mast die Zellen gezwungen werden können, Nahrungsstoffe weit über den nötigen Bedarf zu verbrennen. Der Grundumsatz stieg dabei beträchtlich an, die Steigerung betrug etwa 40 Proz. Allerdings hat es sich hier um extreme Zustände gehandelt, die Nahrungszufuhr betrug das Dreifache des Minimalbedarfes. Man muß hier zwei Möglichkeiten ins Auge fassen: Entweder gibt es eine obere Grenze der Nahrungszufuhr, über welcher das physiologische Kostmaß zu einem pathologischen wird, das die Zellen zwingt, ihr Prärogativ in der Bestimmung der Größe des Kraftwechsels aufzugeben und in Anpassung an das gesteigerte Angebot weit über den Bedarf zu verbrennen; oder die Luxuskonsumption bei Mast stellt nur ein extremes Beispiel mit maximalen Ausschlägen dar für einen Vorgang, den man auch bei geringfügigeren Nahrungsmengensteigerungen in geringerem Ausmaße müßte feststellen können.

Wir haben uns auf Initiative von Prof. *Pirquet* neuerdings mit dieser Frage beschäftigt und untersuchten den Einfluß, den quantitative Änderungen der Nahrungszufuhr auf den Kraftwechsel haben, ob mit anderen Worten eine Steigerung des Nahrungsangebotes die Zelle zu erhöhter Verbrennung veranlaßt. Solche Untersuchungen sind besser am Erwachsenen durchzuführen, da beim Kinde in längeren Versuchsperioden die Wachstumsverhältnisse nicht ohne Einfluß sind; doch sind unsere Versuchsperioden verhältnismäßig so kurzdauernd, daß wir diese Einflüsse vernachlässigen können. Die Untersuchungen wurden an sechs Kindern durchgeführt und ergaben in allen Fällen das gleiche Resultat.

Der Kraftwechsel wurde durch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach *Krogh* festgestellt. Unter gleichbleibenden Bedingungen stellte er sich beim einzelnen Kinde immer auf eine bestimmte Höhe ein, so daß Änderungen seiner Größe in Serienuntersuchungen zu Schlußfolgerungen berechtigen, selbst wenn es beim Kinde sehr schwer ist, während der Untersuchung jenen Grad von Muskelentspannung zu erreichen, den man beim Erwachsenen zur Bestimmung des Grundumsatzes fordert.

Wir gaben den Kindern zuerst durch 10 Tage täglich gleichbleibend eine Nahrungsmenge, welche ihren Bedarf gerade deckte und sie im gleichen Gewicht erhielt. Die quantitative Nahrungsbemessung geschah nach den

Normen des *Pirquet*schen Ernährungssystems. Qualitativ war die Nahrung eine gemischte Kost aus Eiweiß, Fett und Kohlehydraten, wobei die drei Bestandteile in immer demselben Mischungsverhältnis gereicht wurden; der Eiweißgehalt betrug konstant etwa 16 Proz. des kalorischen Wertes der ganzen gereichten Nahrung. Die Zahlen für die gereichten Kostmengen sind aus der Legende zur ersten Abbildung ersichtlich. Nachdem sich in wenigen Tagen der Grundumsatz auf ein ziemlich gleichbleibendes Niveau eingestellt hatte, erhöhten wir unvermittelt von einem Tag auf den nächsten die Nahrungsmenge auf das Doppelte; dies geschah so, daß jede einzelne Speise der ersten Periode nun in doppelter Menge verabreicht wurde. Damit blieb die verhältnismäßige Zusammensetzung von Eiweiß, Fett und Kohlehydrat gewahrt. Diese Nahrungsmenge ist eine sehr reichliche zu nennen, aber keine exzessive, und sie wird die von manchen Vielessern gewohnheitsmäßig genossenen Mengen nicht übersteigen. Die Kinder blieben bei gutem Appetit, klagten kaum über die Fülle der zu bewältigenden Nahrung, und die Ausnützung war gut, soviel sich aus der makroskopischen Besichtigung der mäßig gesteigerten Stuhlmenge schließen ließ.

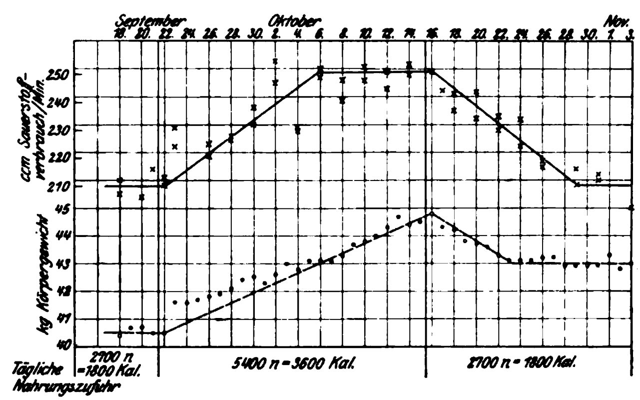


Abb. 1. Die Verdopplung der täglichen Nahrungsmenge führt zu einer 20 proz. Erhöhung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes. Kind *Marie Maslo*, $11^1/_2$ Jahr alt, 77 cm Sitzhöhe.

Es zeigte sich nun, daß während der reichlichen Nahrungszufuhr der Grundumsatz allmählich im Verlauf von 2 bis 3 Wochen bis zu einem gewissen Niveau anstieg, welches beiläufig um 20 Proz. höher lag, als der Grundumsatz vordem betrug, und dann weiterhin auf dieser Höhe ziemlich unverändert verharrte, solange die reichliche Ernährung gegeben wurde. Diese allmähliche Einstellung auf die höhere Ebene vollzog sich in einem Falle in 14 Tagen, in einem anderen Falle dauerte es 3 Wochen. Als durch eine Reihe von Tagen der Grundumsatz nicht mehr stieg, reduzierten wir wieder unvermittelt von einem Tag zum anderen die Nahrungsmenge auf die Hälfte. Der Sauerstoffverbrauch begann alsbald abzusinken, doch geschah dies ganz allmählich, und es dauerte 10 bis 14 Tage, bis der niedrige Wert der ersten Versuchsperiode wieder erreicht war.

Das Körpergewicht war während der ganzen Zeit der reichlichen Ernährung gleichmäßig angestiegen; nach Reduktion der Nahrung auf die Hälfte fiel es wieder etwas ab, doch bei weitem nicht so tief, daß es den Wert bei Beginn des ganzen Versuches erreichte.

Diese Ergebnisse lassen mehrere Deutungen zu. Die einfachste Erklärung wäre die, daß die Erhöhung des Kraftwechsels nicht den Grundumsatz betrifft, sondern daß wegen der großen Nahrungsmenge auch nach 15 Stunden noch nicht der Zustand der Nüchternheit erreicht ist. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch würde also ein Ausdruck der vermehrten Verdauungsarbeit sein. Nach allem, was wir über den Energieverbrauch wissen, den die Arbeit der einzelnen Organe kostet, können wir eine Erhöhung des Kraftwechsels um 20 Proz. nicht auf eine bloße Steigerung der Verdauungstätigkeit zurückführen, die zudem nach 15 Stunden schon im Ausklingen sein müßte. Gegen eine solche Auffassung spricht auch, daß gerade in den ersten Versuchstagen, wo man am ehesten erwarten müßte, daß die Verdauung sich noch nicht an die vergrößerte Nahrungsmenge angepaßt hat, die Werte des Sauerstoffverbrauchs geringer sind als später. Und das nur allmähliche Heruntergehen des Sauerstoffverbrauchs nach Aussetzen der großen Nahrungsmenge spricht in gleicher Weise dagegen, da schon nach 1 bis 2 Tagen die Verminderung und Verkürzung der Darmarbeit deutlich werden müßte. Zur Widerlegung der Ansicht, daß der erhöhte Grundumsatz einen Zustand des Nichtnüchternseins bedeuten könnte, machten wir noch folgende Untersuchung: Wenn 15 Stunden nach der Nahrungseinnahme die Darmtätigkeit noch nicht zur Ruhe gekommen ist und den Sauerstoffverbrauch hochhält, so müßte doch nach 24stündiger Nahrungsenthaltung die Darmverdauung beendigt und der Sauerstoffverbrauch abgesunken sein. Wir fanden sowohl in der Periode mit geringer, als auch mit doppelter Nahrungsmenge, daß nach 24stündigem Hungern der Sauerstoffverbrauch nicht geringer ist, als nach 15stündiger Nüchternheit; die Werte waren nach 24 Stunden sogar etwas höher (beiläufig um 2 Proz.), was wohl damit zusammenhängt, daß die 15-Stunden-Untersuchung morgens geschah, während die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach 24 Stunden in den Nachmittag fiel, eine Zeit, wo nach den bekannten Tagesschwankungen der Stoffwechsel reger ist als morgens. Eine verzögerte Darmverdauung ist somit als ausschlaggebender Grund für den erhöhten Grundumsatz nicht in Betracht zu ziehen.

Es ließe sich denken, daß die Nahrungsstoffe durch die sogenannte spezifisch-dynamische Wirkung die Erhöhung des Kraftumsatzes herbeiführen. Da diese Wirkung erst dann zur Geltung kommt, wenn die Nahrung resorbiert ist und im Blute kreisend die Gewebszellen erreicht (*F. Benedict*, *G. Lusk*), so könnte sie auch dann noch für die Erhöhung des Energieumsatzes in Frage kommen, wenn die Darmverdauung schon beendigt ist und wenn der Zustand der Nüchternheit erreicht ist. Aber nach der 24stündigen Nahrungsenthaltung müßte die spezifisch-dynamische Wirkung schon abgeklungen sein, oder doch wenigstens an Intensität nachgelassen haben. Wir sahen aber, wie eben erwähnt, daß auch nach 24 Stunden der Kraftwechsel unvermindert hoch blieb. Unsere Versuchsanordnung, die viele Faktoren, z. B. die Stickstoffbilanz, nicht berücksichtigt, erlaubt es nicht, mit Sicherheit die Auffassung auszuschließen, daß Reizstoffe irgendwelcher Art, die aus der Nahrung stammen, an der Erhöhung des Grundumsatzes teilnehmen.

Man muß es wohl ablehnen, die Steigerung des Grundumsatzes auf die Steigerung des Körpergewichtes zu beziehen. Eine rasche Vermehrung der Körpermasse beruht vorwiegend auf Wasser- und Fettansatz und nur zum geringsten Teil auf der Speicherung von Glykogen und labilem Eiweiß. Alle diese Stoffe bedeuten keine Vermehrung des „atmenden Protoplasmas“,

von dem man annimmt, daß seine Stoffwechselintensität allein die Größe des Sauerstoffverbrauchs bestimmt. Selbst vom gespeicherten Eiweiß nimmt man an, daß es als tote Reservesubstanz an der Atmung aktiv nicht teilnimmt. Eiweißmast führt ja nur bei gleichzeitigem Training zu Vermehrung des lebenden Protoplasmas. Überdies steht die Vermehrung des Sauerstoffverbrauchs und das Ansteigen des Körpergewichts in unseren Versuchen nicht im gleichen Verhältnis. Vermindert man nach einer Periode reichlicher Kost die Nahrungsmenge wieder auf den knappen Tagesbedarf (Abb. 1), so steht das Körpergewicht höher als zu Beginn der Mast, der Sauerstoffbedarf ist aber wieder auf denselben niedrigen Anfangswert abgesunken. Wir haben es aus diesen Gründen auch unterlassen, den Sauerstoffverbrauch auf das Kilogramm Körpergewicht zu beziehen und irgendwelche Schlüsse aus einer solchen Kombination zu folgern.

Am wahrscheinlichsten ist uns eine vierte Art der Erklärung, nämlich daß die Steigerung des Kraftwechsels wirklich als Steigerung des Grundumsatzes anzuerkennen ist, wozu wir berechtigt sind, wenn Grundumsatz und Ruhe-Nüchtern-Umsatz identisch sind. *Die Erhöhung der Nahrungszufuhr von der Erhaltungskost auf die doppelte Menge hat eine Steigerung des*

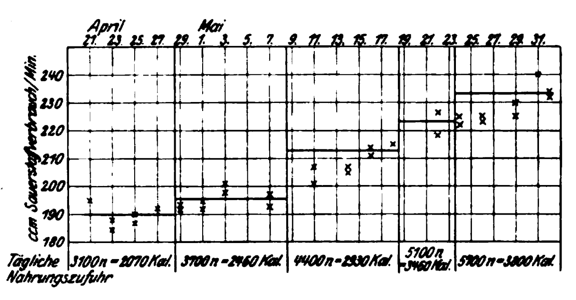


Abb. 2. Bei jeder stufenweisen Erhöhung der täglichen Nahrungszufuhr steigt der Ruhe-Nüchtern-Umsatz entsprechend an. Kind *Hermine Salsborn*, 12 Jahr alt, 78,5 cm Sitzhöhe, 33,6 kg Gewicht.

Kraftwechsels um 20 Proz. im Ruhe-Nüchtern-Umsatz bewirkt. Diese Steigerung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte allmählich in 2 bis 3 Wochen, blieb aber dann auf der erreichten Erhöhung bestehen, solange die reichliche Nahrungszufuhr andauerte. *Der Ruhe-Nüchtern-Umsatz hat sich zu dem erhöhten Angebot in ein neues, entsprechendes Gleichgewicht gesetzt.*

Wir haben gesehen, daß auf Zufuhr reichlicher, aber nicht extrem zu nennender Nahrungsmengen der Ruhe-Nüchtern-Umsatz in verhältnismäßig kurzer Zeit sich auf ein höheres Niveau einstellte. Es war nicht anzunehmen, daß die Steigerung der Nahrungszufuhr erst oberhalb einer bestimmten Schwelle eine Steigerung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes herbeiführe und daß weniger beträchtliche Zulagen zur Erhaltungskost ohne Einfluß bleiben würden. Um diese Frage zu entscheiden, gingen wir so vor, daß wir zu einer Nahrungsquantität, welche den Tagesbedarf eben überschritt, stufenweise in zehntägigen Perioden verhältnismäßig kleine Zulagen hinzufügten und nun den Sauerstoffverbrauch des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes bestimmten. Auch hier beachteten wir, daß die Zusammensetzung der einzelnen Tagesmengen aus Eiweiß (16 Proz.), Kohlehydraten und Fett verhältnismäßig gleich blieb. Das eindeutige Ergebnis dieser Versuchsreihe (Abb. 2) ist, *daß auf jede auch verhältnismäßig geringe Steigerung der Nahrungszufuhr*

der Ruhe-Nüchtern-Umsatz eine entsprechende Erhöhung erfuhr. War durch einige Tage eine etwas größere Tagesmenge an Nahrung zugeführt worden, so war schon nach wenigen Tagen der Ruhe-Nüchtern-Kraftwechsel mit einer ganz regelmäßigen Erhöhung seines Umsatzes nachgefolgt.

Aus den Ergebnissen unserer zwei Versuchsreihen muß man daher unseres Erachtens den Schluß ziehen, daß die Nahrungszufuhr nicht nur eine vorübergehende Steigerung des Kraftwechsels zur Folge hat, welche man mit Verdauungsarbeit und mit spezifisch-dynamischer Wirkung der Nahrungsstoffe erklärt, sondern daß die Nahrungszufuhr auch je nach der Menge der zugeführten Nahrungsstoffe zu dem Umfang des gesamten Kraftwechsels in Beziehung tritt, so daß sie auch im Ruhe-Nüchtern-Umsatz in Erscheinung kommt. Dies gilt nicht nur für die abundante Nahrungszufuhr, womit auch der Luxuskonsum in irgend einer Hinsicht anerkannt wird, sondern für jede Nahrungsmenge. „Grundumsatz" und Ernährungsverhältnisse treten zueinander in Beziehung und stellen sich aufeinander ein.

In weiterer Konsequenz muß man aus diesen Tatsachen folgern, daß es einen absoluten Grundumsatz nicht gibt. Ein krasses Beispiel hierfür bietet der Winterschlaf. Sehr große Schwankungen des respiratorischen Gaswechsels waren an winterschlafenden Säugetieren festgestellt worden (*Pembrey*, *Hári* u. a.). Während des tiefen Winterschlafes betrug z. B. die Kohlensäureausscheidung einer Fledermaus 1 bis 2 Proz. des Hungerstoffwechsels im Wachen. Stieg die Umgebungstemperatur auf 6°, so wurde der Schlaf weniger tief, und der Stoffwechsel stieg auf etwa 40 Proz. an. Weniger ausgiebige vorübergehende Änderungen im Kraftwechsel des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes sind der klinischen Beobachtung in großer Zahl bekannt, wenn auch nicht immer im Experiment verifiziert. Man denke z. B. an den Kraftwechsel unterkühlter Frühgeburten, bei denen alle Lebensäußerungen herabgesetzt sind, oder an den Energieumsatz von Hungerkünstlern.

Von den mannigfachen Einflüssen, welche auf den Ruhe-Nüchtern-Umsatz Wirkung ausüben können, haben wir in der vorliegenden Arbeit nur die Nahrungszufuhr untersucht. Wir möchten den Einfluß der Nahrung auf den Ruhe-Nüchtern-Umsatz nicht alimentär in dem Sinne nennen, daß ein reichliches Angebot die Zelle direkt zu erhöhten Verbrennungen animiert, wir möchten uns den Mechanismus des vermehrten Energieumsatzes mehr indirekt vorstellen. Unsere Theorie ist folgende: Abgesehen von den Verhältnissen im unmittelbaren Anschluß an die Nahrungsaufnahme (Verdauungsarbeit, spezifisch-dynamische Wirkung) richtet die Zelle die Größe ihres Aufwandes nach der Menge der gespeicherten Reservestoffe ein. Sind die Speicher durch länger dauernde, reichliche Nahrungszufuhr gefüllt, so lebt die Zelle aus dem Vollen und der laufende Umsatz wird groß sein. Sind die Depots von „labilem" Eiweiß und Zucker wenig gefüllt oder leer, so wird der Kraftumsatz sparsam sein. *Die allgemeine Intensität des Kraftwechsels im Ruhe-Nüchtern-Umsatz* (und wahrscheinlich auch bei jeder Arbeit) *ist* (unter anderem) *eine Funktion des Ernährungszustandes*; wobei unter Ernährungszustand nicht nur die Menge des gespeicherten Fettes, sondern auch die Reserven an gespeichertem, nicht atmendem Eiweiß und Zucker verstanden sind. Eine gleiche Anschauung liegt implizite der Arbeit von *Zillich* zugrunde, wenn darin gesagt wird, die Zunahme eines Kindes sei vom Ernährungszustande abhängig; bei gutem Ernährungszustande seien zur Erreichung einer gleich großen Gewichtszunahme größere Nahrungsmengen nötig, als bei mageren Kindern.

Wenn wir die eben ausgesprochene Theorie zur Erläuterung unserer Versuche heranziehen, so können wir sagen: Werden nach der Periode der

knappen Kost reichliche Nahrungsmengen gegeben, so füllen sich zuerst die vordem leeren Speicher, und in dem Maße, als die Depots voll werden, wird die Aufspeicherung neu zugeführter Nahrung schwerer, und es wird davon eine immer größere Menge verbrannt, als dem bloßen Ersatz entspricht. Der Zeitpunkt, wann die Speicherung von Zucker und insbesondere von Eiweiß vollendet ist und alle überschüssige Nahrung verbrannt wird, soweit sie nicht als Fett abgelagert werden kann, gibt sich daran zu erkennen, daß der Ruhe-Nüchtern-Umsatz nicht mehr steigt, sondern auf gleicher Höhe verharrt. Die Fähigkeit, Fett zurückzulegen, ist bei den meisten Menschen wohl sehr groß und die Fettspeicherung scheint auch in unseren Fällen nicht aufgehört zu haben, da während der ganzen Zeit der reichlichen Nahrungszufuhr das Körpergewicht regelmäßig anstieg. Sicherlich werden individuelle Verschiedenheiten eine Rolle spielen, und bei Menschen, deren Fähigkeit zu Fettbildung und Fettansatz groß ist, wird die Erhöhung des Grundumsatzes durch reichliche Nahrungsmengen erst spät und weniger ausgiebig in Erscheinung treten, als bei solchen Menschen, welche trotz reichlicher Ernährung und guter Ausnutzung mager bleiben. Bei solchen schlechten Fettbildnern wird ein größerer Teil der Nahrung der vermehrten Verbrennung anheimfallen.

Da der „Grundumsatz“ nichts Fixiertes ist, sondern gleitend nach der Nahrungsmenge und dem Ernährungszustand, so ist anzunehmen, daß er auch während der Verdauung seine Größe ändert und eine beträchtliche Steigerung erfährt. Wieviel von der Erhöhung des Kraftwechsels während der Nahrungsaufnahme und der Verdauung, der eigentlichen Verdauungsarbeit, wieviel der sogenannten spezifisch-dynamischen Wirkung und wieviel der Steigerung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes zuzuschreiben ist, ist nicht leicht auseinanderzuhalten. Wir halten es für wahrscheinlich, daß die sogenannte spezifisch-dynamische Wirkung nicht nur auf Reizen beruht, welche von den Nahrungsstoffen ausgehen, sondern teilweise eine Steigerung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes ist, welche während der Verdauung auftritt und auf die gleiche Weise zu erklären ist, wie die Steigerung des Umsatzes nach reichlicher Nahrungszufuhr, die im Ruhe-Nüchtern-Verbrauch erscheint. Zu unseren Anschauungen paßt wohl auch, daß nach *Rubners* eigener Angabe die spezifisch-dynamische Wirkung bei knapper Erhaltungskost nicht auftritt, sondern erst bei reichlicher Nahrungszufuhr deutlich wird.

Es handelt sich bei den mitgeteilten Untersuchungen nur um Rohversuche in dem Sinne, daß über die Wirkung der einzelnen Nahrungskomponenten nichts ausgesagt werden kann. In einer weiteren Mitteilung wird über laufende Versuche, in denen der Einfluß von Eiweiß, Kohlehydraten und Fett gesondert auf den Ruhe-Nüchtern-Umsatz untersucht wird, berichtet werden.

Zusammenfassung.

Bei sechs Kindern wurde nach einer Reihe von Tagen, in denen eine knappe Erhaltungskost (mit Gewichtsstillstand) gegeben worden war, unvermittelt die tägliche Nahrungsmenge verdoppelt, während die qualitative Zusammensetzung der Kost unverändert blieb. Der Ruhe-Nüchtern-Umsatz stieg darauf stetig an, um nach 14 bis 20 Tagen sich auf eine maximale Höhe gleichbleibend einzustellen, welche ungefähr um 20 Proz. höher lag als der Ruhe-Nüchtern-Umsatz während

der Periode der knappen Kost. Nach unvermittelter Reduktion der Nahrungsmenge auf die ursprüngliche Erhaltungskost sank der Ruhe-Nüchtern-Umsatz langsam wieder ab, um im Verlauf von 14 Tagen das Ausgangsniveau zu erreichen. Eine solche gegenseitige Einstellung von Ruhe-Nüchtern-Umsatz und gereichter Nahrungsmenge wurde in geringerem Grade auch dann beobachtet, wenn die Koststeigerungen wenig bedeutend waren; bei stufenweiser Vermehrung der Nahrungszufuhr konnte auch eine stufenweise Erhöhung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes festgestellt werden. Die Luxuskonsumption wird als ein extremes Beispiel dieser Steigerung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes angesehen.

Die Erklärung der Steigerung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes nach Vergrößerung der Nahrungsmenge darf man nicht in einer verzögerten Verdauung suchen, da sowohl in der Periode der geringen, als auch zurzeit der reichlichen Nahrungszufuhr nach 24stündigem Hungern der Umsatz ebenso hoch geblieben war, wie 15 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme. Aus dem gleichen Grunde erscheint auch die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungsstoffe oder der Einfluß irgendwelcher Reizstoffe der verdauten Nahrung auf den Ruhe-Nüchtern-Umsatz unwahrscheinlich. Dagegen spricht weiter, daß es nach Absetzen der reichlichen Nahrungszufuhr etwa 14 Tage dauert, bis der Ruhe-Nüchtern-Umsatz den tiefen Stand wieder erreicht hat. Die Kraftwechselsteigerung durch Vergrößerung der Nahrungsmenge wird vielmehr als Erhöhung des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes anerkannt.

Aus den Versuchen geht hervor: *1. Nahrungsmenge und Ruhe-Nüchtern-Umsatz stellen sich immer in ein bestimmtes Gleichgewichtsverhältnis ein; jede Steigerung der Nahrungsmenge erhöht den Ruhe-Nüchtern-Umsatz.*

2. Es gibt keinen absoluten Grundumsatz.

3. Die Größe des Ruhe-Nüchtern-Umsatzes ist eine Funktion des Ernährungszustandes, bzw. der stärkeren oder geringeren Füllung der Speichen.

Literatur.

Grafe, Literaturangaben bei *Noorden-Salomon*, Handbuch der Ernährungslehre I. — *Krogh*, Wien. klin. Wochenschr. 1922. — *Lusk*, Med. 1, 1922. — *Benedict*, Journ. of biol. Chem. **20**, 1915. — *Pembrey*, Journ. of Physiol. **29**, 1903. — *Hári*, Pflügers Arch. **130**, 1909. — *Zillich*, Nahrungsmenge und Ernährungszustand. In *Pirquets* System der Ernährung **4**. Berlin 1920. — *Rubner*, Gesetze des Energieverbrauches bei der Ernährung. Wien 1902.

Über die enzymatische Zerlegung von Hexose-mono-phosphorsäure durch Extrakte des Femur.

Von

Y. Takahashi.

(Aus dem KaiserWilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 27. Januar 1924.)

Hexose-mono-phosphatase findet sich nach den Feststellungen von *C. Neuberg*[1]), *M. Tomita*[2]) sowie *J. Noguchi*[3]) in pflanzlichen und animalischen Zellen. Über die Fähigkeit verschiedener tierischer Organe, auch die gewöhnliche Hexose-di-phosphorsäure zu spalten, haben jüngst *E. Forrai*[4]) sowie ich selbst[5]) erneut berichtet[6]). Bei dieser Gelegenheit habe ich bereits erwähnt, daß auch das Abbauprodukt der Hexose-di-phosphorsäure, das man im Reagenzglase leicht gewinnen kann, nämlich die *Hexose-mono-phosphorsäure*, von den Enzymen des Femurs hydrolysiert werden kann. Eine besondere Bekanntgabe der einschlägigen Versuche scheint mir deshalb angebracht, weil jüngst *R. Robison*[7]) in einer sehr bemerkenswerten Mitteilung zu zeigen vermochte, daß ein bestimmtes, den Hexose-di-phosphorsäure-ester begleitendes isomeres Zucker-mono-phosphat durch ein Ferment zerlegbar ist, das im Femur vorhanden ist. Der von *Robison* verwendete Hexose-mono-phosphorsäure-ester ist nach der wichtigen Entdeckung von *Harden* und *Robison*[8]) ein Produkt des Hefestoffwechsels und, soweit man bisher weiß, nicht aus der Hexose-di-phosphorsäure erhältlich; er ist auch durchaus verschieden von der Hexose-mono-phosphorsäure, die früher *Neuberg*[9]) durch gemäßigte Säurehydrolyse künstlich aus dem Hexose-di-phosphat dargestellt hatte. Im Gegensatze zu dieser Verbindung ist das Isomere stark rechtsdrehend; hierdurch sowie durch seine sonstigen Eigenschaften weicht das Monophosphat *Robisons* von dem *Neuberg*schen Ester ab. Eine Untersuchung aber gerade des letzteren war deshalb angebracht, weil es durchaus im

---

1) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 432, 1918. — 2) *M. Tomita*, ebendaselbst **131**, 170, 1922. — 3) *J. Noguchi*, ebendaselbst **143**, 190, 1923. — 4) *E. Forrai*, ebendaselbst **145**, 47, 1924. — 5) *Y. Takahashi*, ebendaselbst **145**, 178, 1924. — 6) Ein Hinweis auf die Arbeit von *R. A. H. Plimmer* (Biochem. Journ. **7**, 43, 1913) ist früher leider versehentlich unterblieben und sei deshalb nachgeholt. — 7) *R. Robison*, Biochem. Journ. **17**, 286, 1923. — 8) *A. Harden* und *R. Robison*, Proc. Chem. Soc. **30**, 16, 1914; *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922. — 9) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 432, 1918.

Bereiche der Möglichkeiten liegt, daß bei der Verwertung der gewöhnlichen Hexose-di-phosphorsäure der Weg über das Monophosphat eingeschlagen wird[1]), d. h. daß — wie bei biochemischen Vorgängen so häufig — ein stufenweiser Abbau vor sich geht. Wenn also dem Hexose-di-phosphat eine wichtige physiologische Rolle zukommt, so dürfte sie auch dem Monophosphat eigen sein. In der erwähnten Mitteilung hat *Robison* die Hypothese aufgestellt, daß die im ossifizierenden Knorpelgewebe vorhandenen Fermente aus jener isomeren Hexose-mono-phosphorsäure anorganisches Phosphat in Freiheit setzen und für die Knochenbildung zur Verfügung stellen. Falls diese Voraussetzung zutrifft, so muß sie in gleichem Maße für das erste hydrolytische Spaltungsprodukt der Hexose-di-phosphorsäure, eben für den *Neuberg*schen Ester, gelten.

Nach meinen Beobachtungen wird diese Substanz in der Tat durch ein Ferment des Femurs unter Abgabe anorganischen Phosphats gespalten, und ich belege meine Befunde mit nachstehenden Daten.

Als Ausgangsmaterial diente das hexose-mono-phosphorsaure Barium, das durch partiellen Abbau von hexose-di-phosphorsaurem Calcium oder Barium mit Hilfe von Oxalsäure gemäß der Vorschrift von *Neuberg* (l. c.) gewonnen worden war. Das erhaltene wasserlösliche hexose-mono-phosphorsaure Barium war mehrfach aus wässeriger Lösung mittels Alkohol umgefällt und sicher frei von dem kaum löslichen Salze des Hexose-di-phosphorsäure-esters. Aus der Bariumverbindung wurde durch genaue Umsetzung mit Glaubersalz das Natriumsalz gewonnen; es kann direkt in wässeriger Lösung verwendet werden. Bei vorsichtiger Darstellung enthält die Flüssigkeit kein Alkaliphosphat, das durch sekundäre Zersetzung entstehen kann.

Versuch 1 (bei 37°).

A. 100,0 ccm der 2proz. Natriumsalzlösung, 10,0 ccm 5proz. Knochenextrakt[2]), 1,5 ccm Toluol.

B. 100,0 ccm 2proz. Natriumsalzlösung, 10,0 ccm Wasser, 1,5 ccm Toluol.

C. 100,0 ccm Wasser, 10,0 ccm 5proz. Knochenextrakt, 1,5 ccm Toluol.

Der Ansatz B liefert die Zahlen für die Menge anorganischer Phosphorsäure, die durch Selbstzersetzung der Natriumsalzlösung beim

[1]) Versuche hierüber sind im Gange.

[2]) Der Femurextrakt wurde in der Weise bereitet, daß der von Fleisch und Blut sorgfältig befreite Femur in einer Reibschale mit toluolhaltigem Wasser gründlich verrieben wurde. Das Gemisch wurde darauf in eine Glasstöpselflasche übergeführt und dann 3 Stunden im Brutschrank bei Körpertemperatur digeriert. Die erhaltene Fermentlösung wurde nunmehr filtriert und in den angegebenen Mengenverhältnissen zu den Spaltungsversuchen benutzt.

Aufbewahren auftritt. Durch den Ansatz C gewinnt man die Kenntnis, wieviel anorganisches Phosphat von dem Knochenextrakt eventuell selber geliefert wird.

Die Ergebnisse sind in folgender kleinen Tabelle zusammengefaßt. Es zeigt sich in ihr die mit der Zeit zunehmende Spaltung des angewandten Substrats.

PO_4 in 100,0 ccm

Nach Tagen	im Hauptversuch A	in Kontrolle B	in Kontrolle C
1	0,0375	nicht wägbar	nicht wägbar
2	0,0511	0,0140	"
3	0,0584	0,0150	"
4	0,0618	0,0183	"

Es sind demnach in 4 Tagen rund 7 Proz. des Hexose-mono-phosphorsäure-esters zerlegt worden.

Versuch 2 (bei 37°).

A. 100,0 ccm der 2proz. Lösung von hexose-mono-phosphorsaurem Natrium, 50,0 ccm 5proz. Knochenextrakt, 1,5 ccm Toluol.

B. 100,0 ccm 2proz. Natriumsalzlösung, 50,0 ccm Wasser, 1,5 ccm Toluol.

C. 100,0 ccm Wasser, 50,0 ccm 5proz. Femurextrakt, 1,5 ccm Toluol.

PO_4 in 100,0 ccm

Nach Tagen	im Hauptversuch A	in Kontrolle B	in Kontrolle C
1	0,0247	nicht wägbar	nicht wägbar
2	0,0277	"	"
4	0,0494	0,0168	"
5	0,0695	0,0192	"
6	0,0826	0,0209	"
7	0,0844	0,0211	"

Mit der größeren Menge Femurenzym gelangte ich zu einer Spaltung von 10 Proz.

Die Phosphorsäurebestimmungen wurden in gewohnter Weise ausgeführt. Es wurden stets 20,0 ccm der Flüssigkeit angewendet; die abgeschiedenen Mengen waren groß genug, um als $Mg_2P_2O_7$ zur Wägung gebracht zu werden.

Die mitgeteilten Ergebnisse bestätigen von neuem, daß sowohl die synthetischen als die natürlichen wie die durch partiellen Abbau aus letzteren bereiteten Phosphorsäure-ester der Kohlenhydrate dem Angriff von Fermenten zugänglich sind. Im Hinblick auf die Bedeutung, die das Phosphation nach den verschiedensten Richtungen hin besitzt, scheint mir dieses Verhalten der Beachtung wert.

Quantitative Untersuchungen über die Bildung und Herkunft des Acetaldehyds im intermediären Zellstoffwechsel der Warmblüter.

Von

C. Neuberg und A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

I. Befunde und Überlegungen.

Von allen Stoffwechselprozessen sind die Vorgänge beim Umsatz der Kohlenhydrate lange Zeit mit den Schleiern der Undurchdringlichkeit am dichtesten umhüllt gewesen. Eine Besonderheit ist es, die für den Einblick vermehrte Schwierigkeiten schafft. Fette und Proteine werden in ganz durchsichtiger Weise hydrolysiert, und die erzeugten Spaltungsprodukte, die Fettsäuren und die Aminosäuren, treten als kleinste Einheiten in den Abbau, Umbau sowie Aufbau ein; dabei finden Umformungen statt, die auch in der Retorte zu verwirklichen und daher zu überschauen sind. Anders bei den Kohlenhydraten. Selbst die einfachen Zucker, die Monosaccharide, scheinen nur ausnahmsweise für die unmittelbare Verwertung geeignet zu sein. Die maßgeblichen und bedeutungsvollen Umsetzungen vollziehen sich erst nach einer Depolymerisation, nach Zerreißung der sechsgliedrigen Kohlenstoffkette, und gerade diese Transformationen zu Stufen von höherer Labilität und gesteigerter Reaktionsfähigkeit lassen sich im Reagenzglase bislang nicht in befriedigender Weise ausführen. Man ist vornehmlich darauf angewiesen, die vom biologischen Objekte am Zuckermolekül bewirkten Veränderungen Schritt um Schritt zu ergründen und daraus den eingeschlagenen Weg festzustellen.

Die Kohlenhydrate bilden als Träger chemischer und Spender kinetischer Energie die überwiegende Quelle der Kraftleistungen für die meisten Lebewesen. In bezug auf die Gestaltung ihres Stoffumsatzes kann man in groben Umrissen zwei Formen auseinanderhalten: die oxydative Verarbeitung und den sauerstofflosen Verbrauch, je nachdem die Organismen — in großen Zügen -- einen aeroben oder anoxybiotischen Stoffwechsel besitzen. Bei der letzteren Art muß, da ja die Endprodukte noch ein kalorienreiches Material sind, viel Kohlenhydrat zur Deckung des Energiebedarfs in Bewegung gesetzt werden (Typus: Hefe). Beim ersten Falle kommt der Organismus mit erheblich geringeren

Quantitäten des vollständig verbrennenden Zuckers aus (Typus: das warmblütige Tier).

Durch diese Betrachtung der Generalbilanz, bei der natürlich nicht Rücksicht darauf genommen zu werden braucht, daß auch das oxybiotische Dasein anoxybiotische Stadien aufweist, und daß bei anaeroben Geschehnissen oxydative Phasen durchlaufen werden, wird es verständlich, daß Aufklärungen über den intermediären Kohlenhydratumsatz leichter bei anaerob eingestellten Lebewesen als bei den aerob sich erhaltenden Tieren zu gewinnen sind; denn in der Zeiteinheit wird, wenn man gleiche Oberflächen in Betracht zieht, beim nicht oxydativen Zuckerverbrauch mehr Kohlenhydrat umgewandelt. Die Methoden nun, die für die Erforschung der feineren Dissimilationsvorgänge geschaffen wurden, die *Abfangverfahren* von *Neuberg-Färber-Reinfurth*[1]), sind so eingestellt, daß auf der flüchtig durcheilten Bahn des Abbaues gelegene Durchgangsgebilde festgehalten werden. Dieses Ziel wird um so leichter erreichbar sein, je mehr von der passageren Substanz dem Fixationsmittel angeboten wird.

Somit ist es zuerst bei der alkoholischen Zuckerspaltung gelungen[2]), in fast der theoretisch möglichen Menge eine Zwischenstufe zu fassen, den *Acetaldehyd*. Das gleiche glückte bei zahlreichen anderen Gärungsvorgängen, die von mannigfachen Pilzen und Bakterien ausgelöst werden, so bei der Zersetzung der verschiedenen Zucker und verwandter Substanzen (Alkohole, ein- und zweibasischer Oxysäuren) durch Mucorazeen, Endomyces, Monilien, Oidien, Torulaceen, Aspergillusarten, Penicillien, Merulius, Kahmhefen, durch Bakterien der Colisowie der Lactis aerogenes-Gruppe, durch Ruhrerreger, Buttersäurebazillen und dergleichen[2]). Derselbe Befund konnte für die Cellulosegärung[3]) erhoben werden. Überall handelt es sich um den Typus der anaeroben Daseinsform.

Den *ersten und entscheidenden Schritt zur Verwertung dieser Methoden bei regelrecht oxydativ arbeitenden Lebewesen* taten *C. Neuberg* und *F. F. Nord* mit der erfolgreichen Anwendung eines Abfangverfahrens auf den Vorgang der Essiggärung[4]), an deren aerobem Charakter kein Zweifel besteht.

Alle diese Ergebnisse sind mit Hilfe der Methoden gewonnen worden, die sich der sekundären Sulfite oder des Dimedons bedienen. Die begründete Hoffnung, auch in den *oxydativen Stoffwechsel der*

---

[1]) *C. Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **106**, 281, 1920.

[2]) Siehe die Zusammenfassung von *C. Neuberg*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **55**, 3624, 1922.

[3]) *C. Neuberg* und *R. Cohn*, diese Zeitschr. **139**, 527, 1923.

[4]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, ebendaselbst **96**, 158, 1919.

Tiere auf gleichen Wegen einen Einblick tun zu können, erfüllte sich zunächst für die Kaltblütermuskulatur, die eine Übertragung der Dimedonmethode zuließ. *J. Hirsch* hat im hiesigen Institut bereits im Jahre 1921 gezeigt, daß mit ihrer Hilfe *eine Anreicherung des Acetaldehyds gelingt, von dem er kleine Mengen auch ohne Anwendung eines Abfangmittels aus der Muskulatur abdestillieren und mittels der Nitroprussid-Piperidin-Probe zu erkennen vermochte*[1]). Bei den *Organen des Warmblüters* erwies sich unser Sulfitverfahren als leistungsfähig, und zwar in der Gestalt, die ihm für das Arbeiten mit empfindlichen Zellen erteilt worden war[2]). Es handelt sich dabei um die Verwendung des neutralen schwefligsauren Kalkes an Stelle des alkalisch reagierenden Dinatriumsalzes.

Wir haben vor einiger Zeit berichtet[3]), *daß sich in Gegenwart sekundären Calciumsulfits in einer Suspension überlebender Leber- bzw. Muskelzellen von Meerschweinchen oder größerer Warmblüter Acetaldehyd anhäuft.* Die Methode, mit der man dieses — wie uns scheint — beachtenswerte Verhalten zu demonstrieren vermag, ist so einfach, daß wir dem Versuch die Gestalt eines *Vorlesungsexperimentes* erteilen konnten. *Weiter*[4]) *hatten wir dargetan, daß die Acetaldehydmengen ansteigen, wenn als mächtiges Hormon des Zuckerstoffwechsels Insulin einem solchen Ansatz von Leberbrei und sekundärem schwefligsauren Kalk beigemischt wird. Damit war zugleich zum ersten Male das Eingreifen des Insulins in die Abbauvorgänge durch die Charakterisierung eines intermediären Oxydationsproduktes erwiesen.* Schon aus Gründen physikalischer Art, die wir früher[3]) dargelegt haben, muß die Produktion von Acetaldehyd in einem Leberbrei wesentlich geringer sein als bei der Hefengärung. Um eine sichere Basis für die Beurteilung der Bedeutung zu schaffen, die man dem Auftreten von Acetaldehyd in der Warmblüterzelle beimessen darf, waren zwei Bedingungen zu erfüllen: zunächst war der strenge Beweis zu führen, daß der abgefangene Stoff wirklich Acetaldehyd ist; sodann war eine Methode ausfindig zu machen, die unter den innezuhaltenden Bedingungen die quantitative Bestimmung des Acetaldehyds zuläßt.

An sich ermöglicht das Abfangverfahren, das sich auf die Verwendung von sekundären schwefligsauren Salzen stützt, die Fixation beliebiger Carbonylverbindungen. Zwar herrscht die Gesetzmäßigkeit, daß die Beständigkeit der sich bildenden Carbonyl-Sulfit-Komplexe mit steigendem Molekulargewicht der organischen Komponenten ab-

[1]) *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **117**, 113, 1921; **134**, 415, 1922.

[2]) *C. Neuberg*, Zeitschr. f. Botanik **11**, 180, 1918.

[3]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr. **2**, 1458 (Julinummer), 1923.

[4]) *C. Neuberg*, *A. Gottschalk* und *H. Strauss*, Deutsch. med. Wochenschrift **1923**, Nr. 45.

nimmt, so daß der Acetaldehyd alle kohlenstoffreicheren Carbonylsubstanzen verdrängen müßte. Jedoch war es unumgänglich notwendig, Gewißheit darüber zu erlangen, daß tatsächlich Acetaldehyd und nur dieser vorliegt. Auch dieser Nachweis ist geglückt, und wir berichten darüber in der nachstehenden Mitteilung[1]).

Angesichts der sehr viel bescheideneren Quantitäten von Acetaldehyd, die sich in der tierischen Zelle überhaupt ansammeln können, war der Methode zu ihrer quantitativen Erfassung besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Das bewährte Verfahren der titrimetrischen Ermittlung des Acetaldehyds nach *Ripper* verliert seine Anwendungsmöglichkeit, wenn es sich um kleine Mengen Acetaldehyd handelt. Die Gründe dafür sind im folgenden gelegen: das Vorgehen beruht darauf, daß man die zu analysierende Aldehydlösung zu einer Bisulfitlösung bekannten Gehaltes fügt und nach erfolgter Vereinigung von Acetaldehyd mit einem Teil des Bisulfits das ungebundene Quantum des letzteren jodometrisch zurücktitriert. Bei großer Verdünnung machen sich jedoch zwei Schwierigkeiten störend geltend. Einmal wird der dissoziative Zerfall des Aldehyd-Sulfit-Komplexes so stark oder, was auf dasselbe herauskommt, es erfolgt die Vereinigung von Acetaldehyd und schwefliger Säure so unvollständig, daß man zuviel freie schweflige Säure finden würde[2]), andererseits verläuft die jodometrische Titration der schwefligen Säure in dünnen Lösungen unregelmäßig und ist mit bisher noch nicht geklärten Fehlern behaftet[3]). Diese beiden Umstände verleihen der Titration große Unsicherheit, und Kontrollversuche in den zu erwartenden Verdünnungsbereichen lehrten uns, daß die Aldehydbestimmung ungenau ausfiel. Die Verhältnisse liegen eben vollständig anders als bei der Hefengärung und bei den bakteriellen Zuckerspaltungen, bei denen man den Acetaldehyd grammweise und in hoher Konzentration gewinnt. Dagegen bietet nun das ursprünglich zur Analyse des Formaldehyds empfohlene Prinzip von *A. Brochet* und *R. Cambier*[4]), das auch *Sieber*[5]) angewandt hat, die Möglichkeit, befriedigende Daten für den Acetaldehyd zu gewinnen. Die Methode der Autoren sieht eine Reaktion zwischen Aldehyd und Hydroxylamin-chlorhydrat vor, bei der das Oxim und freie Salzsäure entstehen. *R. Sieber* gibt (l. c.) an, daß dieses Vorgehen rund 9 Proz. zu niedrige Werte liefert, und *E. Hägglund*[6]),

---

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 185, 1924.

[2]) Vgl. *W. Kerp*, Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt **21**, 1904.

[3]) Vgl. z. B. *Gmelin-Kraut*, I, 1 und 2, S. 459; *Cl. Winkler*, Maßanalyse, S. 95.

[4]) *A. Brochet* und *R. Cambier*, C. r. **120**, 449, 1895.

[5]) *R. Sieber*, Chem.-Ztg. **45**, 349, 1921.

[6]) *E. Hägglund*, Acta Academiae Abonensis, Mathematica et Physica II, 1923.

der einen Vergleich der Sulfit-Titrationsmethode und des Hydroxylaminverfahrens ausgeführt hat, findet für Mengen von etwa 0,03 g Aldehyd Übereinstimmung zwischen beiden Verfahren, im ganzen aber auch ein um etwa 7 Proz. zu niedriges Resultat. Bei etwa 30fach größerer Verdünnung — und das ist etwa die Zone, die für unsere aldehydhaltigen Destillate aus tierischen Organen in Betracht kommt — beobachteten wir das gleiche, nämlich auch ein Manko von 9 bis 10 Proz. der absoluten Menge. Die Titration der aus dem Hydroxylaminsalz durch den Acetaldehyd in Freiheit gesetzten verdünnten Säure fällt etwas schärfer aus, wenn man statt des Chlorhydrats das Sulfat des Hydroxylamins benutzt.

Im Besitze eines nunmehr hinreichend genauen Aldehydbestimmungsverfahrens waren wir in der Lage, die Acetaldehydmengen festzustellen, die mit Hilfe des Abfangmittels in der Leber und Muskulatur an sich oder nach Zugabe verschiedener, die Aldehydbildung beeinflussender Stoffe ans Tageslicht gefördert werden.

Wir orientierten uns zunächst über die von der normalen Meerschweinchenleber in 24 Stunden gebildete Menge abfangbaren Acetaldehyds.

Zu diesem Zwecke suspendierten wir den lebensfrischen Brei aus 15 g Leber (dem durchschnittlichen Gewicht der Meerschweinchenleber) in 75 ccm einer phosphatgepufferten Tyrodelösung ($p_H = 7{,}0$) unter Zusatz von 1,5 g Calciumsulfit und 0,7 g Optochin. basicum (als Desinfizienz) und ließen den Ansatz 24 Stunden lang bei 38° im Brutschrank stehen.

Das früher herangezogene Desinfektionsmittel Rivanol (2-Äthoxy-6,9-amino-akridin) haben wir verlassen, weil dieses Diamin zwar kaum mit dem an Sulfit gebundenen Acetaldehyd reagiert, wohl aber bei der erforderlichen nachfolgenden Zerlegung der Aldehyd-Doppelverbindung sich nach Art des Phenylendiamins mit dem Acetaldehyd in der Hitze umsetzt und die Ausbeute vermindert.

Tabelle I gibt das Ergebnis einer Anzahl solcher Versuche wieder.

Tabelle I.

Acetaldehydbildung durch überlebende Zellen des Leberbreies von Meerschweinchen. Nach 24stündigem Stehen bei 38° in Tyrode-Phosphatlösung unter Zusatz von Calciumsulfit und Optochin. basicum wurden gefunden:

Nr.	Acetaldehyd (berechnet auf 100 g Leberbrei) mg	Nr.	Acetaldehyd (berechnet auf 100 g Leberbrei) mg
1	5,07	5	5,14
2	5,59	6	6,95
3	4,77	7	5,19
4	4,08		

Fügt man zu der Leberzellensuspension abbaufähige Kohlenhydrate, so steigt bei Innehaltung sonst gleicher Bedingungen die Menge abfangbaren Acetaldehyds.

Tabelle II.
Acetaldehydbildung durch überlebende Zellen des Leberbreies nach Zusatz verschiedener Kohlenhydrate in 1proz. Lösung unter sonst unveränderten Verhältnissen.

Acetaldehyd in der Kontrolle (berechnet auf 100 g Gewebsbrei) mg	Zugefügtes Kohlenhydrat	Acetaldehyd im Zusatzversuche (berechnet auf 100 g Gewebsbrei) mg	Zunahme in mg um
6,45	Glykogen	8,80	+ 2,35
5,53	"	8,49	+ 2,96
4,38	d-Fruktose	5,21	+ 0,83
6,45	"	8,25	+ 1,80
5,53	"	6,46	+ 0,93
7,14	Dioxyaceton	8,02	+ 0,88
6,16	"	6,97	+ 0,81

Weil das als Antiseptikum benutzte Optochinum basicum die Gewebsatmung überlebender tierischer Zellen nachweisbar hemmt und außerdem der Suspension einen nicht erwünschten Grad von Alkaleszenz verleiht ($p_H > 8,0$), so gingen wir zu kurzfristigen (5-Stunden-) Versuchen über, bei denen die Zugabe eines Desinfizienz unter den von uns befolgten Versuchsbedingungen nicht notwendig war. Um jedoch keine geringeren absoluten Erträge an Acetaldehyd zu erhalten, nahmen wir zu jedem Ansatz die zwei- bis dreifache Quantität der sonst verarbeiteten Lebermenge und stellten fest, in welchem Ausmaße durch Hinzufügen von Insulin[1]) die Bildung von Acetaldehyd vermehrt wird.

Nachfolgend ist das Resultat eines solchen kurzfristigen Versuches ohne und mit Hormonzugabe angeführt:

50 g Leberbrei[2]) (Meerschweinchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung ($p_H = 6,5$) + 2,0 g Calciumsulfit; 5 Stunden bei 40°.

Menge des gebildeten Acetaldehyds 1,37 mg.

50 g Leberbrei[2]) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung ($p_H = 6,5$) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit; 5 Stunden bei 40°.

Nach 2½ Stunden Zusatz von weiteren 0,5 ccm Insulin.

Menge des gebildeten Acetaldehyds: 3,29 mg.

Der 5-Stunden-Versuch liefert natürlich relativ niedrigere Aldehydwerte, als sie bei eintägiger oder längerer Einwirkung des Abfangsmittels erhalten wurden. Jedoch werden die schwer übersehbaren Unregelmäßigkeiten ausgeschaltet, die infolge Schädigung der Zellen durch das Antiseptikum oder infolge dessen Umsetzung mit entstandenem Acetaldehyd auftraten.

---

[1]) Zu allen Versuchen, bei denen Insulin verwendet wurde, diente das Präparat von *Brand*.

[2]) Hier wie auch sonst war stets das Material mehrerer Lebern zusammen aufs feinste zerkleinert, gut gemischt und dann in gleiche Portionen geteilt.

Tabelle III. Acetaldehydbildung des Leberbreies[1]) von Meerschweinchen nach fünfstündigem Stehen in Tyrode-Phosphatlösung ($p_H = 6,5$) + Insulin bei 40°.

Zusatzversuche:

Ohne Zusatz mg	Mit *Glykogen* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Hexose-di-phosphorsäure* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Hexose-mono-phosphorsäure* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *d-Fruktose* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *d-Glucose* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *d,l-Glycerinaldehyd* mg	Steigerung um
2,11	5,69	3,58 mg = 170 Proz.	3,09	5,65	2,65 mg = 82 Proz.	2,75	4,93	2,18 mg = 79 Proz.	3,43	5,15	1,72 mg = 50 Proz.	4,10	5,67	1,57 mg = 38 Proz.	3,03	6,39	3,36 mg = 110 Proz.

Ohne Zusatz mg	Mit *Dioxyaceton* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Milchsäure* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Glykolaldehyd* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Mannit* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Glycerin* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Glycerinsäure* mg	Steigerung um
3,03	5,04	2,01 mg = 66 Proz.	2,39	0,79	—1,60 mg = —67 Proz. (Hemmung)	3,09	4,97	1,88 mg = 60 Proz.	2,90	3,93	1,03 mg = 35 Proz.	4,10	4,71	0,61 mg = 15 Proz.	2,39	3,12	0,73 mg = 30 Proz.
			2,78	2,66	—0,12 mg = — 5 Proz. (Hemmung)												

Ohne Zusatz mg	Mit *Glycerinphosphorsäure* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Buttersäure* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Äthylalkohol* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *a-Alanin* mg	Steigerung um	Ohne Zusatz mg	Mit *Glykokoll* mg	Steigerung um
2,67	3,18	0,51 mg = 19 Proz.	2,78	2,54	— 0,24 mg = — 9 Proz. (Hemmung)	2,67	8,44	5,77 mg = 216 Proz.	2,11	5,27	3,16 mg = 150 Proz.	2,90	2,90	—

[1]) Berechnet auf 100 g feuchten Leberbrei.

Es ergibt sich in bester Übereinstimmung mit unseren älteren Befunden, daß unter der Einwirkung von Insulin die Quantität des abfangbaren Acetaldehyds im Leberbrei um ein Mehrfaches wächst.

In genau der gleichen Weise wird die von uns früher beschriebene Acetaldehydbildung in überlebenden Muskelzellen durch Insulinzusatz gesteigert.

Beleg:

32,5 g Muskelbrei (Meerschweinchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 2,0 g Calciumsulfit; 5 Stunden bei 40°.

Menge des gebildeten Acetaldehyds 0,42 mg.

32,5 g Muskelbrei (Meerschweinchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit; 5 Stunden bei 40°.

Nach 2½ Stunden Zusatz von weiteren 0,5 ccm Insulin.

Menge des gebildeten Acetaldehyds 0,95 mg.

Der Wirkungsmechanismus des Insulins wird dadurch beleuchtet, daß seine Anwesenheit eine unzweifelhafte und quantitativ meßbare Vermehrung des Acetaldehyds herbeiführt, der als eine Durchgangsstufe im intermediären Abbau zu betrachten ist. Wir haben uns in den folgenden Versuchen des Hormons als Stimulans der Abbauprozesse bedient. Die Kombination von 5-Stunden-Versuch mit Insulinzusatz ist fortab beibehalten worden; sie ergibt eine Versuchsanordnung, mit deren Hilfe feststellbar ist, ob ein Stoff durch Zellen warmblütiger Tiere zu Acetaldehyd abgebaut wird. Mit dieser Methodik versuchten wir Aufschluß über die *Herkunft* und *Bildungsweise* des im Zellstoffwechsel von uns nachgewiesenen *Acetaldehyds* zu erhalten.

Zu diesem Zwecke wurden in Serienversuchen die verschiedensten Substanzen der Kohlenhydrat- und Fettreihe sowie Aminosäuren auf ihre Fähigkeit zum Übergang in Acetaldehyd geprüft.

In der Tabelle III (s. S. 170) sind einige der wichtigsten Befunde vereinigt.

Aus den mehr als 150 Einzelversuchen, von denen wir einige typische Beispiele in den nachstehenden Versuchsprotokollen beschreiben, läßt sich *folgendes ableiten:*

1. *Unter Anwendung des bewährten Abfangmittels für Aldehyd — d. h. in Gegenwart von sekundärem Calciumsulfit — gelingt es auch in kurzdauernden Versuchen regelmäßig und sicher, den im intermediären Stoffwechsel überlebender Warmblüterzellen entstehenden Acetaldehyd festzulegen und nachzuweisen.*

2. *Die Mengen des auf diese Weise abgefangenen Acetaldehyds können mit Hilfe einer alkalimetrischen Titrationsmethode quantitativ ermittelt werden.*

3. *Durch Zugabe bestimmter Zuckerarten zu dem Gemisch von Leberbrei und Calciumsulfit wird die Ausbeute an Acetaldehyd erheblich gesteigert.*

4. Der Kohlenhydratumsatz in Leber- und Muskelzellen läßt sich dadurch anfachen, daß man als Hormon des tierischen Zuckerstoffwechsels Insulin hinzufügt. Damit wird eine Erhöhung des Aldehydertrages um etwa das $2^1/_2$fache erreicht.

5. Die Reihenfolge, in der sich in bezug auf Wirksamkeit als Acetaldehydbildner die geprüften Substanzen der Kohlenhydratreihe anordnen lassen, war: Glykogen, d, l-Glycerinaldehyd, Zymophosphat, Hexose-mono-phosphorsäure, Dioxyaceton, Glykolaldehyd, d-Fructose, d-Glucose.

6. Von den nicht unmittelbar zur Gruppe der eigentlichen Zucker gehörenden Substanzen erzeugten am meisten Acetaldehyd: Äthylalkohol und a-Alanin; in geringerem Maße waren d-Mannit sowie d, l-Glycerinsäure und am schwächsten Glycerin und Glycerin-phosphorsäure dazu imstande.

7. Da das Glykogen von allen für den Eigenstoffwechsel der Leberzellen wichtigen Substanzen sich als der stärkste Acetaldehydbildner erwiesen hat, erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß der ohne besondere Zusätze im überlebenden Gewebebrei auftretende Acetaldehyd auf präformiertes Glykogen zurückzuführen ist.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse bestätigen erneut die im Vergleich zur Glucose leichtere Einbeziehung der Fructose in den Stoffumsatz der Leberzellen und lassen als *eine* Ursache dieser Sonderstellung den erleichterten Übergang in eine Oxydationsstufe erkennen. Des weiteren darf aber auch aus dem Vergleich der Aldehydausbeuten nach Zufuhr von Glykogen einerseits, von Fructose und Glucose andererseits gefolgert werden, daß keine der beiden Hexosen mit der eigentlichen labilen Reaktionsform des Zuckers identisch ist. Seine Natur ist vorab noch unbekannt, und die öfter vorgenommene Gleichsetzung mit dem Enolgebilde, das *A. Wohl* und *C. Neuberg*[1]) im Jahre 1900 aus ganz anderen Gesichtspunkten heraus formuliert hatten, entbehrt der Begründung.

Von Bedeutung für die Wandlungsfähigkeit der Zucker dürfte — in Analogie zu den Verhältnissen bei der Muskulatur — *auch* für die Leber die Kuppelung der Kohlenhydrate an Phosphorsäure sein. Unsere Versuche sprechen dafür, daß der Abbau phosphorylierter Kohlenhydrate, und zu diesen gehört ebenfalls das Glykogen[2]), von den Leberzellen leichter vollzogen wird als die Spaltung der betreffenden freien Saccharide.

Weshalb die Milchsäure im Gegensatz zu allen anderen geprüften Glykogenbildnern die Acetaldehydausbeuten unbeeinflußt läßt, ist

---

[1]) *A. Wohl* und *C. Neuberg*, Ber. **33**, 3099, 1900.

[2]) Vgl. die Beschreibung der Phosphorsäure-ester von *Neuberg* in *C. Oppenheimers* Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **1**, 531, 1924.

nicht ohne weiteres zu sagen. Im Hinblick auf die noch in vieler Hinsicht ungeklärte Stellung der Milchsäure im oxydativen Stoffwechsel ist jedenfalls die Tatsache hervorzuheben, daß diese wichtige Verbindung in der Leberzelle zu keiner Aldehydentstehung Anlaß gibt unter Bedingungen, die für andere Substanzen günstig liegen[1]).

Den Körpern, die zur Kohlenhydratreihe nicht in einfacher Beziehung stehen, wie Buttersäure und Glykokoll, geht die Fähigkeit ab, die Aldehydproduktion zu beeinflussen. Man wird daraus schließen dürfen, daß in Acetaldehyd eben nur diejenigen Materialien übergehen können, die Kohlenhydrate sind, oder von der überlebenden Zelle zu solchen unter den herrschenden Bedingungen umgeformt werden oder deren Spaltungsprodukte mit den wahrhaft labilen Durchgangsstufen der in der Norm von der Leberzelle abgebauten Kohlenhydrate zusammenfallen.

In diesem Zusammenhange verdient die starke Fähigkeit des Äthylalkohols zur Acetaldehydbildung besondere Erwähnung. Seitdem *F. Battelli* und *L. Stern*[2]) sowie *Parnas*[3]) gezeigt haben, daß in den tierischen Organen und namentlich in der Leber ein Ferment vorhanden ist, das Aldehyde nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion zu den entsprechenden Alkoholen und Säuren umlagert, ist es klar, daß beträchtlichere Mengen von Acetaldehyd ohne künstliche Eingriffe von der Art unserer Abfangsverfahren sich nicht anhäufen können. Es erscheint daher die Ansicht begründet, daß die notorisch in den Tierorganen auftretenden Spuren von Äthylalkohol der fermentativen Dismutation von Acetaldehyd ihr Entstehen verdanken. Andererseits

---

[1]) Anm. bei der Korrektur: Verwiesen sei auf die beachtenswerte Mitteilung von *A. P. Briggs, J. Koechig, E. A. Doisy* u. *C. J. Weber* (Journ. biol. Chem. 58, 721, 1924), die im Blut unter Insulinwirkung verstärkte Milchsäurebildung fanden, aber nichts von vermehrtem Abbau bemerkten. Die Daten, die jüngst *E. Toenniessen* (H. **133**, 158, 1924) zugunsten der Annahme anführt, daß Milchsäure die Quelle des Acetaldehyds sei, müssen wir nach eigenen Erfahrungen für unrichtig halten. Der Verfasser hat unsere in der „Klin. Wochenschr. **1923**, Nr. 31 und Deutsch. med. Wochenschrift **1923**, Nr. 45" für Leber- und Muskelzellen von Warmblütern beschriebene Versuchsanordnung auf Gemische von Muskel- und Pankreasbrei übertragen, aber die S. 167 dargelegten Verhältnisse bei den quantitativen Bestimmungen außer acht gelassen. Es kommt im 24-Stunden-Ansatz mit 10 g Rindsmuskulatur zu Aldehydwerten (0,66 mg), welche die mit exakter Methode ermittelten Zahlen um das Vierfache übertreffen. (Im Mittel ergab sich uns aus 100 g Muskelbrei vom Rinde nach 24 Stunden eine Acetaldehydmenge von 1,5 mg, d. h. aus 10 g Gewebebrei nur 0,15 mg.) Des Verfassers Zahlen sind also ungenau, ebenso wie sein Zitat, gemäß dem er als erster die spontane Aldehydbildung in Organen beobachtet hätte; vgl. damit die Literaturbelege in dieser Abhandlung S. 166.

[2]) *F. Battelli* und *L. Stern*, diese Zeitschr. **28**, 145, 1910.

[3]) *J. Parnas*, ebendaselbst **28**, 274, 1910.

ist der Weingeist im Tierkörper leicht verbrennlich, und man muß ganz analog wie für die Essigsäuregärung annehmen, daß der Abbau mit der Oxydation zum Acetaldehyd beginnt. Wir wissen nicht, ob der Acetaldehyd dann direkt zu Essigsäure verbrannt wird, deren Schicksal bisher nicht mit Sicherheit festgestellt ist, oder ob der durch Oxydation von Alkohol gebildete Acetaldehyd dadurch beseitigt wird, daß immer von neuem die Dismutation sich vollzieht, d. h. stetig Essigsäure und abermals zu oxydierenden Alkohol liefert. Jedenfalls läßt sich eine erhebliche Anhäufung von Acetaldehyd erzielen, wenn die überlebende Zelle in Gegenwart eines Abfangmittels mit dem Äthylalkohol in Berührung tritt. Im Durchblutungsversuch hat übrigens früher *N. Masuda*[1]) aus Äthylalkohol eine flüchtige und Jod bindende Substanz hervorgehen sehen, die er aber nicht mit Sicherheit als Acetaldehyd anzusprechen wagte. Schon heute sei darauf hingewiesen, daß auch noch andere Substanzen, z. B. Fumarsäure, über Acetaldehyd abgebaut werden.

Die von uns erhobenen Befunde zeigen, daß der Acetaldehyd im intermediären Zellstoffwechsel des Warmblüters eine wichtige Rolle einnimmt. Sie geben Aufschluß über die Herkunft dieses so wandlungsfähigen Körpers und Hinweise auf den Modus seiner Entstehung. Die erhaltenen Zahlen sind, wie auseinandergesetzt ist, nur Minimalwerte[2]). Um so eher können sie eine Grundlage bilden bezüglich der öfters erörterten Anteilnahme des Acetaldehyds an synthetischen Vorgängen, d. h. für seine Verwendung durch Kondensation und Umbau zu kohlenstoffreicheren Substanzen (vgl. die Carboligasewirkung).

Nicht zu verwundern ist es, daß eine aus so viel Quellen sich herleitende Substanz wie der Acetaldehyd im Blute und Harne vorgefunden werden kann [*W. Stepp* und *R. Feulgen*[3])]. Möglicherweise sind gewisse Bestandteile der Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise die Substanzen mit Aminogruppen im Blute und die Thiosulfate des Urins, „physiologische Abfangmittel" für den Acetaldehyd, die kleine Mengen unter günstigen Bedingungen festzulegen und vor der anderweitigen Verarbeitung zu schützen vermögen.

Zu der seit mehr als einem halben Jahrhundert mit den Zuckern in Beziehung gebrachten Milchsäure tritt der Acetaldehyd als das zweite mit Sicherheit erkannte intermediäre Umwandlungsprodukt der Kohlenhydrate in tierischen Zellen. Daß er schwerer zu isolieren

---

[1]) *N. Masuda*, diese Zeitschr. **45**, 140, 1912.

[2]) Gemäß unseren S. 168 und 176 beschriebenen Feststellungen sind die Werte mindestens um 10 Proz. zu erhöhen; wir haben jedoch stets die analytisch wirklich ermittelten Daten angeführt.

[3]) *W. Stepp*, diese Zeitschr. **127**, 13, 1922; *W. Stepp* und *R. Feulgen*, H. **114**, 301; **119**, 72, 1922.

ist und auch nur in geringerer Menge angehäuft werden kann als die Milchsäure, die das Erzeugnis einer zeitweiligen Stabilisierung des im Zerfall begriffenen Zuckermoleküls darstellt, hängt mit der sehr viel größeren Labilität des Acetaldehyds zusammen. Die Milchsäure erscheint vornehmlich als ein Produkt der Depolymerisation und intramolekularen Sauerstoffverschiebung, aber nicht als eine eigentliche Abbaustufe. Das Verhältnis der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff ist im Zucker, $C_6H_{12}O_6$, das gleiche wie in der Milchsäure, $C_3H_6O_3$. Dementsprechend vollzieht sich auch der Übergang von Zucker in Milchsäure mit geringer Energieabgabe. Die wahre oxydative Verwertung des Zuckers betrifft Stoffe, die eine andere Figuration als Milchsäure aufweisen. Während letztere nach unseren bisherigen Kenntnissen keineswegs als ein konstantes Stoffwechselerzeugnis im Haushalte der Kleinlebewesen gelten kann, erscheint der Acetaldehyd als ein viel universelleres Gebilde des intermediären Stoffumsatzes. Er liegt eindeutig auf der Bahn des Abbaues, der sich uns in der Aufteilung des Zuckers bzw. seiner primären Umwandlungsprodukte in ungleiche Reste, in solche mit einem Kohlenstoffatom und in solche mit einer zweigliedrigen Kohlenstoffkette, offenbart.

II. Methodisches.

Um die Genauigkeit des *Hydroxylaminsulfatverfahrens* zur Analyse von Acetaldehydmengen, wie sie bei unseren Organversuchen in Betracht kamen, zu ermitteln, nahmen wir folgende Prüfungen vor:

1. Beispiel: Von einer relativ starken Acetaldehydlösung, deren Gehalt nach *Ripper* zu 0,9779 Proz. bestimmt war, wurde eine Verdünnung 1 : 100,0 hergestellt, so daß theoretisch in 10,0 ccm dieser Lösung 0,000978 g Acetaldehyd vorhanden waren.

Bestimmung nach dem Hydroxylaminverfahren:

10,0 ccm Aldehydlösung blieben mit 0,20 ccm 4proz. Hydroxylaminsulfatlösung 60 Minuten bei 30° stehen.

0,20 ccm 4proz. $(NH_2.OH)_2H_2SO_4$-Lösung verbrauchten an sich 0,04 ccm n/10 NaOH. (Methylorange als Indikator.)

Das Reaktionsgemisch verbrauchte 0,24 ccm n/10 NaOH. (Methylorange als Indikator.)

In 10,0 ccm der titrierten Aldehydlösung wurden demnach gefunden: $0,24 - 0,04 = 0,20 \times 0,0044 = 0,00088$ g Acetaldehyd, d. h. fast 10 Proz. weniger als der Theorie entspricht.

2. Beispiel: Eine Acetaldehydlösung, die 1,7111 g Aldehyd in 100 ccm enthielt, wurde auf das 50fache verdünnt, so daß in 5,0 ccm dieser Lösung 0,00171 g Acetaldehyd zugegen waren.

Bestimmung nach dem Hydroxylaminverfahren:

5,0 ccm Aldehydlösung ließen wir mit 0,30 ccm 4proz. Hydroxylaminsulfatlösung 1 Stunde bei 30° stehen.

0,30 ccm 4proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung verbrauchten 0,05 ccm n/10 NaOH. (Methylorange als Indikator.)

Das Reaktionsgemisch verbrauchte 0,40 ccm n/10 NaOH. (Methylorange.)

In 5,0 ccm der titrierten Aldehydlösung waren also nachweisbar: 0,40 — 0,05 = 0,35 × 0,0044 = 0,00154 g Acetaldehyd, d. h. 10 Proz. weniger als die Theorie verlangt.

3. Beispiel: Von einer 0,4704proz. Acetaldehydlösung wurde eine Verdünnung 1 : 40 bereitet; theoretisch müßten in 10,0 ccm dieser Lösung 0,001176 g Acetaldehyd anwesend sein.

Bestimmung nach dem Hydroxylaminsulfatverfahren:

10,0 ccm Aldehydlösung + 0,20 ccm 4proz. Hydroxylaminsulfatlösung 60 Minuten bei 30°.

0,20 ccm 4proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung verbrauchten 0,04 ccm n/10 NaOH. (Methylorange als Indikator.)

Das Reaktionsgemisch verbrauchte 0,28 ccm n/10 NaOH. (Methylorange als Indikator.)

In 10,0 ccm der titrierten Aldehydlösung waren demnach enthalten: 0,28 — 0,04 = 0,24 × 0,0044 = 0,001056 g Acetaldehyd, d. h. es wurden gegen die Theorie 10 Proz. zu wenig gefunden.

Die Fehlergrenze der von uns benutzten Hydroxylaminsulfatmethode ist also innerhalb 10 Proz. gelegen. Bei Anwendung von n/10 Natronlauge ist der Umschlag von Methylorange in den gelben Farbenton so scharf, daß er auf einen winzigen Tropfen der von uns benutzten, in 200 Teilstriche graduierten 2-ccm-Mikrobürette bei einiger Übung genau angegeben werden kann.

Das verwendete Hydroxylaminsulfat war sorgfältig aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, so daß es gegen Methylorange nahezu neutral war. Die nicht zu vermeidende dissoziative Spaltung des Salzes in verdünnter Lösung wurde vor jeder Titration durch eine Leerbestimmung ermittelt und die gefundene Zahl von dem Titrationswerte des Hauptversuches abgezogen.

Nachfolgend seien zwei Versuche angeführt, aus denen die beschränkte Eignung des *Rivanols* als Desinfizienz für solche Organversuche hervorgeht, bei denen es sich um quantitative Aldehyderfassung handelt:

1. Acetaldehyd + Rivanol.

a) 10,0 ccm einer rund 0,55proz. Acetaldehydlösung blieben mit 50 ccm Bisulfitlösung 50 Minuten bei Zimmertemperatur stehen.

Die Titration nach *Ripper* ergab 0,0552 g Acetaldehyd.

b) 10,0 ccm dieser Aldehydlösung wurden in eine Glasstöpselflasche gefüllt und 24 Stunden bei 37° belassen.

c) 10,0 ccm der gleichen Aldehydlösung wurden zusammen mit 0,5 g Rivanol in einer Glasstöpselflasche 24 Stunden lang bei 37° aufbewahrt.

Zu b). Nach 24 Stunden am absteigenden Kühlsystem mittels Dampf indirekt destilliert. Vorlage 2 ccm aqua dest. in Eis. Destillat 27,0 ccm. Durch Titration nach *Ripper* sind 0,05281 g Acetaldehyd wiedergefunden worden.

Zu c). Nach 24 Stunden Destillation über 5 g Calciumcarbonat (sonst wie oben). Titration nach *Ripper* ergab 0,01626 g Acetaldehyd.

Die Gegenwart von 0,5 g Rivanol hatte im vorliegenden Falle einen Aldehydverlust von etwa 70 Proz. bedingt.

2. Acetaldehyd + Rivanol + Calciumsulfit.

a) Für 10,0 ccm einer etwa 0,5proz. Acetaldehydlösung ermittelten wir als genauen Gehalt 0,05055 g Acetaldehyd.

b) 10,0 ccm der gleichen Aldehydlösung + 40 ccm H_2O wurden mit 0,2 g Rivanol + 5 g Calciumsulfit 24 Stunden lang bei 37° digeriert. Nach 24 Stunden Destillation über 5 g Calciumcarbonat (wie oben). Wiedergefunden wurden 0,03442 g Acetaldehyd.

In Anwesenheit von 0,2 g Rivanol (und 5 g Calciumsulfit) belief sich nach der Destillation das Defizit an Aldehyd auf 32 Proz.

Selbst bei Verwendung sehr geringer Mengen von Rivanol (0,2 g) treten infolge von Umsetzungen bei Siedetemperatur also Aldehydverluste auf, die bei exakten Versuchen nicht vernachlässigt werden können.

Anders liegen die Verhältnisse bei Benutzung von freiem *Optochin* als Antiseptikum. Wir geben im folgenden zwei Versuche wieder, aus denen hervorgeht, daß dieses *Morgenroth*sche Alkaloid die Bildung und Zerlegung des Acetaldehyd-Sulfit-Komplexes nicht behindert.

1. a) 10,0 ccm 0,9proz. Acetaldehydlösung + 70 ccm H_2O + 3,0 ccm 10proz. Hydroxylaminsulfatlösung blieben 60 Minuten bei 30° stehen.

Bei Titration mittels n Natronlauge: verbraucht 2,02 — 0,03 = 1,99 ccm n NaOH.

Acetaldehyd = 1,99 × 0,044 = 0,08756 g.

b) 10,0 ccm der gleichen Aldehydlösung + 70 ccm H_2O wurden mit 0,5 g Optochin. basicum sowie 3 g Calciumsulfit in einer Glasstöpselflasche 24 Stunden bei 37° aufbewahrt und sodann über 3 g Calciumcarbonat destilliert. Destillat 70,0 ccm und hierin mittels der Hydroxylaminmethode: 0,08668 g Acetaldehyd. Die Optochinbase bindet oder zerstört also Acetaldehyd nicht.

Um darüber Auskunft zu erlangen, ob Optochin etwa in Gegenwart von Gewebebrei für sich Acetaldehyd abspaltet, wurde je ein Organversuch unter Zusatz von 0,5 g und 2,0 g des Alkaloids vorgenommen.

2. a) 21,2 g Leberbrei von Meerschweinchen + 80 ccm Tyrode-Phosphatlösung + 3 g Calciumsulfit + 0,5 g Optochinbase bei 37°. Nach 24 Stunden in der später (s. S. 178) näher beschriebenen Weise behandelt. Destillat 15,0 ccm und darin 0,0011 g Acetaldehyd.

b) 21,2 g Leberbrei von Meerschweinchen + 80 ccm Tyrode-Phosphatlösung + 3 g Calciumsulfit + 2,0 g Optochin. basicum 24 Stunden bei 37°. Darauf, wie weiter unten, destilliert. Angereichert auf 15,0 ccm, worin 0,0009 g Aldehyd.

Es entsteht also aus Optochin. basicum (Äthyl-hydrocuprein) in Gegenwart von Gewebebrei kein Acetaldehyd.

Bei Anstellung der Versuche, die Optochin. basicum als keimtötendes Mittel enthielten, gingen wir so vor, daß wir 15 bis 20 g fein zerkleinerten Leberbreies in 75 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 7,0) suspendierten, 0,7 g Optochinbase sowie 2 g frisch gefälltes Calciumsulfit hinzufügten und das Gemisch unter öfterem Lüften und Umschütteln in einer korkverstopften Glasflasche 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37° beließen.

Die zu den Versuchen mit Optochin benutzte Suspensionsflüssigkeit stellten wir uns auf folgende Weise her:

Stammlösung 1: 20,0 g NaCl, 0,5 g KCl, 0,5 g $CaCl_2$, 0,25 g $MgCl_2$ mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Stammlösung 2: 2,0 ccm m/3 NaH_2PO_4, 4,0 ccm m/3 Na_2HPO_4, auf 100 ccm H_2O aufgefüllt.

12 ccm Stammlösung 1 + 138 ccm aqua dest. + 6 ccm Stammlösung 2 + 144 ccm aqua dest.; nach dem Zusammengießen p_H = 7,0.

Zu den kurzfristigen 5-Stundenexperimenten dienten stets drei Ansätze. Zu dem ersten, der Kontrolle, nahmen wir durchschnittlich 33 g Leberbrei, suspendierten denselben in 100 ccm einer Tyrode-Phosphatlösung und setzten 1 ccm Insulin (*Brand*) sowie 2 g frisch gefälltes Calciumsulfit hinzu. Ansatz 2 und 3 enthielten die gleichen Bestandteile und außerdem noch 1 g des auf die Fähigkeit zur Aldehydbildung zu prüfenden Stoffes. Jeder der drei Ansätze wurde gut durchgeschüttelt, in einen Brutschrank von 40° gestellt und des öfteren unter Lüften umgeschwenkt. Nach 2½ Stunden wurde zu jeder Portion noch 0,5 ccm Insulin gegeben. Um die Insulinwirkung nicht abzuschwächen, bedienten wir uns bei dieser Versuchsanordnung einer etwas saureren Tyrode-Phosphatlösung. Die Stammlösung 2 war diesmal folgendermaßen zusammengesetzt: 5,0 ccm m/3 NaH_2PO_4 und 2,0 ccm m/3 Na_2HPO_4 aufgefüllt mit Wasser auf 100 ccm; $p_H = 6,5$.

Die Aufarbeitung der Ansätze — Optochin- bzw. 5-Stundenversuche — geschah in der Weise, wie wir es früher[1]) ausführlich beschrieben haben. Um jedoch eine nachteilige Wirkung der starken Alkaleszenz bei den Optochinbase enthaltenden Proben zu verhindern, gaben wir bei der ersten Destillation außer Calciumcarbonat noch 5 g kristallisiertes Calciumchlorid hinzu. Außerdem wurde bei den analytischen Operationen *eine dritte Destillation eingeschaltet*, und zwar aus folgenden Gründen: Bei der Digestion der Organe findet eine Autolyse statt, die mit der Bildung kleiner Mengen Ammoniak einhergehen kann. Wenn man eine alkalimetrische Aldehydbestimmungsmethode anwendet, so muß die zu titrierende Flüssigkeit an sich vollkommen neutral sein. Dies wird dadurch erreicht, daß die ohnehin zur Bindung von Schwefelwasserstoff angewendete Destillation über Bleicarbonat alle flüchtigen (schwachen) Säuren entfernt, während gebildetes Ammoniak durch die eingeschobene Destillation über Schwefelsäure zurückgehalten wird. (Fünf Tropfen H_2SO_4 von 10 Proz.)

Bei dieser Gelegenheit bemerken wir noch, daß die Bestimmung des Acetaldehyds nach einer Oxydationsmethode, etwa nach dem Silberverfahren von *Stepp*, im vorliegenden Falle deshalb nicht gut anwendbar ist, weil sich außer dem Acetaldehyd manchmal Substanzen verflüchtigen, die mit ammoniakalischer Silberlösung reagieren. Das läßt sich dadurch feststellen, daß nach Entfernung des Acetaldehyds durch Destillation über m-Phenylendiaminchlorhydrat dann eine Flüssigkeit vorliegt, die alkalische Silbermischung schwärzt[2]).

III. Versuchsprotokolle.

Zur Sicherung der Ergebnisse haben wir eine sehr große Anzahl von Versuchen, im ganzen über 150, ausgeführt. Zumeist ist Leber von Meerschweinchen zur Verwendung gekommen, gelegentlich auch Kaninchen- und Gänseleber.

Wir beschränken uns auf folgende Belege:

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, l. c.

[2]) Die Bindung des Acetaldehyds an m-Phenylendiamin scheint die Möglichkeit zu bieten, Acetaldehyd von bestimmten flüchtigen Substanzen abzutrennen.

Protokoll a.

1. 26 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
   Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
   Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
   Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
   Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
   Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 15,0 ccm.
   Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) ++.
   12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,17 — 0,07 = 0,10 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,10.4,4.$^5/_4$ = 0,55 mg.
2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Glykogen.
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 15,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion ++++.
   12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,34 — 0,07 = 0,27 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,27.4,4.$^5/_4$ = 1,485 mg.
3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g α-Alanin.
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 15,0 ccm. Nitroprussidreaktion ++++.
   12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,32 — 0,07 = 0,25 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,25.4,4.$^5/_4$ = 1,375 mg.

Protokoll b.

1. 31,3 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
   Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
   Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
   Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
   Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
   Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 18,0 ccm.
   Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) ++.
   15,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_3OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,25 — 0,07 = 0,18 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,18.4,4.$^6/_5$ = 0,95 mg.
2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Dioxyaceton.
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 18,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion +++.
   15,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,37 — 0,07 = 0,30 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,30.4,4.$^6/_5$ = 1,58 mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g d, l-Glycerinaldehyd.
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 18,0 ccm. Nitroprussidreaktion + + + +.
   15,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,45 — 0,07 = 0,38 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,38.4,4.$^6/_5$ = 2,0 mg.

Protokoll c.

1. 32 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
   Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
   Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
   Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
   Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
   Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 25,0 ccm.
   Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) + +.
   20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,25 — 0,07 = 0,18 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,18.4,4.$^5/_4$ = 0,99 mg.
2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g hexose-di-phosphorsaurem Natrium[1]).
   Aufarbeitung wie unter 1. .
   Destillat 25,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion + + +.
   20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,40 — 0,07 = 0,33 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,33.4,4.$^5/_4$ = 1,815 mg.
3. Ansatz wir 1. mit Zugabe von 1 g Glykolaldehyd[2]).
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 25,0 ccm. Nitroprussidreaktion + + +.
   20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,36 — 0,07 = 0,29 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,29.4,4.$^5/_4$ = 1,595 mg.

Protokoll d.

1. 32 g Leberbrei (Kaninchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
   Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
   Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
   Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
   Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
   Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 16,0 ccm.
   Nitroprussid-Piperidinreaktion (in aliquotem Teil) + +.

---

[1]) Frisch hergestellt aus dem Pb-Salz, das nach der Vorschrift von *A. Harden* und *W. J. Young* (diese Zeitschr. **32**, 173 u. ff., 1911) gewonnen worden war.

[2]) Dargestellt nach *H. J. H. Fenton* und *H. Jackson*, Journ. Chem. Soc. **75**. 575, 1899.

12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.

Verbraucht 0,22 — 0,07 = 0,15 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,15.4,4.4/3 = 0,88 mg.

2. Ansatz wie 1. unter Zufügung von 1 g hexose-mono-phosphorsaurem Natrium[1]).

Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 16,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion + + +.

12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.

Verbraucht 0,34 — 0,07 = 0,27 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,27.4,4.4/3 = 1,584 mg.

Protokoll e.

1. 28 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.

Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.

Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.

Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.

Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.

Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) + +.

16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.

Verbraucht 0,28 — 0,07 = 0,21 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,21.4,4.5/4 = 1,155 mg.

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g d-Glucose.

Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 20,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion + + +.

16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.

Verbraucht 0,36 — 0,07 = 0,29 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,29.4,4.5/4 = 1,595 mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Glycerin.

Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 20,0. Nitroprussidreaktion + + +.

16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.

Verbraucht 0,31 — 0,07 = 0,24 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,24.4,4.5/4 = 1,32 mg.

Protokoll f.

1. 32 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.

Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.

Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.

[1]) Unmittelbar vor Gebrauch aus dem Ba-Salz des *Neuberg*schen Esters (diese Zeitschr. 88, 432, 1918) bereitet.

Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.
Nitroprussid-Piperidinreaktion (in aliquotem Teil) + +.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,27 − 0,07 = 0,20 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,20 . 4,4 . 5/4 = 1,10 mg.

2. Ansatz wie 1. unter Zufügung von 1 g d-Fructose.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm. Nitroprussidreaktion + + +.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,37 − 0,07 = 0,30 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,30 . 4,4 . 5/4 = 1,65 mg.

Protokoll g.

1. 32 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.
Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) + +.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,24 − 0,07 = 0,17 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,17 . 4,4 . 5/4 = 0,935 mg.

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g d-Mannit.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion + + +.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,30 − 0,07 = 0,23 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,23 . 4,4 . 5/4 = 1,265 mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Glykokoll.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm. Nitroprussidreaktion + +.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,24 − 0,07 = 0,17 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,17 . 4,4 . 5/4 = 0,935 mg.

Protokoll h.

1. 34,2 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.

Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.
Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) ++.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,22 — 0,07 = 0,15 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,15.4,4.$^5/_4$ = 0,825 mg.

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g milchsaurem Calcium.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion nicht wahrnehmbar.
16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,12 — 0,07 = 0,05 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,05.4,4.$^5/_4$ = 0,275 mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g d, l-glycerinsaurem Calcium[1]).
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillation 22,0 ccm. Nitroprussidreaktion +++.
18,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,27 — 0,07 = 0,20 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,20.4,4.$^{11}/_9$ = 1,07 mg.

Protokoll i.

1. 33 g Leberbrei (Gans) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.
20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,28 — 0,07 = 0,21 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,21.4,4 = 0,924 mg.

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g milchsaurem Natrium.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm.
20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,27 — 0,07 = 0,20 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,20.4,4 = 0,88 mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g n-buttersaurem Kalium.
Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 20,0 ccm.
20,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,26 — 0,07 = 0,19 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd = 0,19.4,4 = 0,836 mg.

---

[1]) Vgl. dessen Abbau zu Acetaldehyd, *K. Nagai*, diese Zeitschr. **141**, 266, 1923.

Protokoll k.

1. 43 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,5) + 1 ccm Insulin (*Brand*) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.
   Nach 2½ Stunden Zugabe von 0,5 ccm Insulin.
   Nach 5 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
   Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
   Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
   Vorlage 2 ccm Wasser. Destillat 20,0 ccm.
   Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) + +.
   16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,28 — 0,07 = 0,21 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,21 . 4,4 . $^5/_4$ = 1,155 mg.
2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1,5 g glycerin-phosphorsaurem Natrium.
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 20,0 ccm. Nitroprussid-Piperidinreaktion + + +.
   16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,32 — 0,07 = 0,25 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,25 . 4,4 . $^5/_4$ = 1,375 mg.
3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 2 ccm aldehydfreiem absoluten Äthylalkohol[1]).
   Aufarbeitung wie unter 1.
   Destillat 20,0 ccm. Nitroprussidreaktion + + + +.
   16,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung, 60 Minuten bei 30°.
   Verbraucht 0,73 — 0,07 = 0,66 ccm n/10 NaOH.
   Acetaldehyd = 0,66 . 4,4 . $^5/_4$ = 3,63 mg.

Herrn *Hoshi* sowie dem *Japanausschuß der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft* danken wir für die Gewährung von Mitteln, mit denen die Ausgaben für einen Teil des Tiermaterials bestritten wurden.

---

[1]) Über m-Phenylendiamin rektifiziert und völlig frei von Aldehyd.

Abtrennung und Identifizierung des im intermediären Stoffwechsel überlebender Warmblüterzellen gebildeten Acetaldehyds.

Von

C. Neuberg und A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

In der voranstehenden Abhandlung haben wir über die Bildung und Herkunft von Acetaldehyd im intermediären Stoffwechsel der überlebenden Zellen verschiedener warmblütiger Tiere berichtet. Bereits bei unseren früheren Befunden sowie in vorausgegangenen älteren Untersuchungen, in denen über diesen Gegenstand aus dem hiesigen Institut Mitteilungen gemacht sind, war darauf hingewiesen worden, daß der Acetaldehyd für die Tierzelle keine geringere Bedeutung besitzt als für den Stoffhaushalt der niederen Organismen. Die experimentellen Schwierigkeiten waren groß. Den Stand der Frage hat noch im Jahre 1921 *J. Hirsch* (s. die voraufgehende Mitteilung) mit den Worten gekennzeichnet: „die erzielten Farbenreaktionen weisen bloß mit geringerer oder größerer Wahrscheinlichkeit auf Aldehyd hin. Die Verhältnisse liegen ähnlich, wie sie bei der alkoholischen Gärung vor den Arbeiten *Neubergs* lagen, indem die in den Endprodukten vorhandenen Aldehydspuren kein Urteil über primäre Bildung oder sekundäre Entstehung des Aldehyds zugelassen hatten und als bedeutungslos galten."

Es schien uns nun eine zwingende Notwendigkeit zu sein, genau wie für das Auftreten von Acetaldehyd im Stoffwechsel der Mikroorganismen auch für die Vorgänge in der Warmblüterzelle den Nachweis zu erbringen, daß der „abgefangene" Stoff wirklich Acetaldehyd ist.

In Anlehnung an die Methodik, die für die Feststellung von Acetaldehyd als Durchgangsstufe bei der alkoholischen Gärung von *Neuberg* und *Reinfurth*[1]) ausgearbeitet worden war, gingen wir folgendermaßen vor. Durch Einwirkung des Bindemittels Calciumsulfit zogen wir das Glied des Acetaldehyds in hinreichender Menge aus der Kette der normalen, sonst weiter umgewandelten Umsetzungsprodukte heraus.

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 391, 397 u. 405, 1918.

*

Durch Zerlegung des Aldehyd-Sulfit-Komplexes gewannen wir sodann eine Acetaldehydlösung, die durch anreichernde Destillation konzentriert wurde. Zum endgültigen Nachweise diente die Überführung in das charakteristische p-Nitrophenylhydrazon. Wir wählten diesen Weg des Nachweises, weil bei der Bildung des genannten Hydrazons wegen der beträchtlichen Molekulargröße, die dem benutzten Reagens zukommt, sich die Gewichtsmenge mehr als vervierfacht.

Dieses scheinbar so einfache Verfahren bietet jedoch etliche Schwierigkeiten. An verschiedenen Stellen haben wir bereits auseinandergesetzt[1]), daß die absolute Ausbeute an Acetaldehyd, sobald man mit Tierzellen arbeitet, wesentlich kleiner sein muß als bei Verwendung einzelliger Mikroorganismen. Es stehen deshalb nur absolut geringe Mengen zur Verfügung. Bei der Umwandlung in das p-Nitrophenylhydrazon hat man darauf zu achten, daß von dem gewählten Reagens sich möglichst wenig dem ausfallenden Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon beimengt, damit die an sich schon begrenzte Substanzmenge nicht durch die Notwendigkeit mehrfachen Umkristallisierens abnimmt. Folgende Arbeitsweise hat zum Ziele geführt.

Vier Kaninchen, von denen jedes rund 2½ kg wog, wurden durch Entbluten getötet. Ihre Lebern wurden noch lebenswarm entnommen und in der mehrfach geschilderten Weise in einen feinen Brei verwandelt, von dem 240 g erhalten wurden. Drei Portionen desselben zu 80 g wurden mit je 300 ccm 0,9proz. Kochsalzlösung sowie mit je 2,7 g Optochinbase nebst 10 g frisch bereiteten sekundären Calciumsulfits bei 37° unter öfterem Lüften und häufigem Schütteln 24 Stunden lang aufbewahrt. Alsdann wurden die vereinigten drei Anteile unter Zugabe von 20 g Calciumchlorid sowie 20 g Calciumcarbonat unter den üblichen Kautelen destilliert (s. voranstehende Mitteilung). Die Redestillation geschah über 2 g Bleicarbonat, wobei eine Konzentration auf 160 ccm eintrat. Alle Rektifikationen erfolgten unter intensivster Kühlung. Die Destillate wurden in einem Standgefäße aufgefangen, das in Eis dicht eingebettet und dessen Boden gerade von einer Wasserschicht bedeckt war.

Die Menge des p-Nitrophenylhydrazins, das in Essigsäure gelöst war, ist so zu bemessen, daß nur ein möglichst spärlicher Überschuß vorhanden ist, weil, wie bemerkt, leicht etwas von dem Reagens mit ausfällt. Nach Zusatz der klar filtrierten Lösung des essigsauren p-Nitrophenylhydrazins, das sofort die charakteristische Gelbfärbung und Trübung bewirkte, wurde kräftig geschüttelt, und schnell ballten sich gelbliche Flocken zusammen. Es empfiehlt sich, nicht länger als eine Stunde stehen zu lassen. Darauf wurde abgesaugt und das Hydrazon

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr., **1923**, Nr. 31; diese Zeitschr. **146**, **164**, 1924.

quantitativ mit der Mutterlauge auf eine kleine Trichternutsche gebracht; nunmehr spülten wir mit 3 ccm 10proz. Essigsäure in kleinen Anteilen nach. Bei vorsichtigem Umkristallisieren aus ganz verdünntem Alkohol gewannen wir ein Material, das sich zunächst bei 112° verflüssigte, ersichtlich aber nicht einheitlich war, indem neben der eigelben Acetaldehydverbindung rötliche Kristalle von p-Nitrophenylhydrazin zu erkennen waren. Durch nochmalige Umkristallisation, bei der eine Spur Tierkohle angewandt wurde, erhielten wir nunmehr eine Verbindung, die nach dem Trocknen im Exsikkator scharf bei 128° schmolz. Unter dem Mikroskop waren jetzt nur einheitliche Kristalle von Nadelform wahrzunehmen. Ausbeute 0,0205 g.

Die Mikroanalyse bestätigte das Vorliegen von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon:

4,38 mg Substanz lieferten 0,902 ccm N_2 (18°, 750 mm, 50 Proz. KOH).

$C_8H_9N_3O_2$. Ber. N = 23,46 Proz.; gef. N = 23,48 Proz.

Somit ist der Beweis dafür erbracht, daß die mit sekundärem Calciumsulfit aus der Aufschwemmung überlebender Leberzellen abgefangene Substanz, deren Bildung wir auf das umgesetzte Glykogen beziehen müssen (vgl. die früheren Ausführungen), Acetaldehyd ist.

Berichtigung

zur Mitteilung von *P. Hári*, diese Zeitschr. **135**, 344, 1923, „Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins" II.:

Die Wellenlängen der Abszissenachse der Abb. 6 auf S. 349 sind um je 20 $\mu\mu$ zu verkleinern, so daß der untersuchte Spektralbereich nicht von 650 bis 510, sondern richtig von 630 bis 490 $\mu\mu$ reicht.

Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit *Warburg* und *Brefeld* „Über die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen" in Band 145, Heft 5/6 dieser Zeitschrift muß es auf Seite 466, Zeile 7 von oben heißen:

„unwirksam sind" (statt wirksam sind).

Einwirkung des Chymosins auf die Eiweißstoffe der Milch.

I. Mitteilung:

Einwirkung des Chymosins auf das Colostrum.

Von

J. Zaykowsky.

(Aus dem milchwirtschaftlichen Institut zu Wologda.)

(Eingegangen am 24. Januar 1924.)

Das Studium der Wirkung des Chymosins hängt vor allem mit der Entscheidung der Frage zusammen, ob das Chymosin als eigenes Ferment existiert, oder ob die dem eigenen Ferment zugeschriebene Gerinnung der Milch dem Pepsin zuzusprechen ist. Außerdem bleibt bis jetzt folgende Frage unentschieden: Beschränkt sich die Wirkung des Labferments, wenn dieses ein selbständiges Ferment ist, auf die Gerinnung der Milch, oder wird ein tieferer Abbau des Caseins hervorgerufen, mit anderen Worten: muß das Chymosin als wahre Protease angesehen werden?

Die Literatur über die angeschnittenen Fragen ist zu zahlreich und zu gut bekannt, als daß sie in der vorliegenden Abhandlung ausführlich angeführt werden könnte. Von allen Angaben, die für die Einheit der beiden Fermente (Chymosin und Pepsin) sprechen, fallen hauptsächlich ins Gewicht erstens die angebliche Unmöglichkeit, das Chymosin vollständig frei von Pepsin und das Pepsin vollständig frei von Chymosin zu erhalten, und zweitens die Behauptung, daß man im Magen der Tiere stets beide Fermente gleichzeitig auffindet. Alle anderen festgestellten Ähnlichkeiten der beiden Fermente würden als eine gründliche Bestätigung ihrer Einheit erscheinen, wenn diese Einheit eine anerkannte Tatsache wäre, jedoch für sich allein betrachtet, können sie für diese Frage entscheidende Bedeutung nicht erlangen.

Hammarsten (1) hat Lösungen von Pepsin bereitet, welche Milch gar nicht gerinnen lassen, und Lösungen von Chymosin, denen die Eigenschaft, Eiweißstoffe zu verdauen, fehlt. Um den Eiweißstoff nicht verdauende Lösungen des Labferments zu erhalten, genügt es, wenn man das Labferment auf entsprechende Weise mit irgend einem Alkali, z. B. Soda, behandelt. Andererseits hat *Pawlow* (2) bei allen Präparaten von Lab proteolytische Eigenschaften gefunden, aber erst nach Entfernung der die Verdauung des Eiweißstoffes hemmenden Stoffe. Als ein die Verdauung hemmender

Stoff (selbstverständlich außer den künstlich eingeführten) erscheint das Antipepsin und der Übergang des Pepsins in die zymogene Form. Bei einer bestimmten H˙-Konzentration wird indessen beides zerstört.

Pawlow gibt in seiner Arbeit (2) keine erschöpfende Erklärung über das Wesen der Erscheinung, daß bei der Einwirkung der Alkalien auf den Magensaft die Wirkung des Pepsins vernichtet wird und die des Labferments nicht.

Wenn das Pepsin und das Chymosin ein und dasselbe Ferment sind, so müssen, nach *Pawlows* Angaben, mit seinem Übergang in die latente (zymogene) Form alle seine Eigenschaften verschwinden und nicht nur einige von ihnen. Die ursprüngliche Wirksamkeit, die durch die allmähliche Neutralisation der zum Magensaft hinzugefügten Soda durch Salzsäure wiederhergestellt wird, muß sich im Falle der Einheit der beiden Fermente an den Eigenschaften beider in gleicher Weise kundgeben, was in den Experimenten von *Pawlow* und *Tichomirow* nicht beobachtet wird. Die Erscheinung der Vernichtung der peptischen Eigenschaften des Magenferments unter dem Einfluß von Alkalien und das nachfolgende Wiederauftreten derselben durch Salzsäure, während gleichzeitig die labenden Fähigkeiten erhalten bleiben, könnte man dadurch erklären, daß die zymogene Form des Pepsins derjenige Stoff ist, welcher die Milch laben kann, die anderen Eiweißstoffe aber nicht verdaut. Diese Annahme ist möglich, aber wenig wahrscheinlich. Für sie spricht die Tatsache, daß fast immer das Vorhandensein des Pepsins mit dem des Chymosins verbunden ist: dann ist es auch leicht, das gleichzeitige Auftreten beider Eigenschaften im Magensaft durch verschiedene quantitative Verhältnisse zu erklären. Bei den erwachsenen Tieren, bei denen durch die bestimmte und mehr oder weniger einförmige Nahrung der Gehalt der freien HCl ungefähr konstant bleibt, sind auch die quantitativen Verhältnisse beider Eigenschaften, d. h. der verdauenden (des Pepsins) und der labenden (des Pepsinogens) ungefähr beständig. Entsprechend der Abwechslung der Nahrung wechselt auch das Vorhandensein der freien Salzsäure, und ebenso stellt sich das Gleichgewicht zwischen dem Zymogen und dem Ferment ein. Eine derartige Erscheinung wird auch bei jungen Kälbern beobachtet. Bei diesen muß außerdem die Einführung großer Mengen von Eiweißstoff in kolloidaler Lösung (Milch) in den Magen von der Bindung einer bestimmten Quantität Salzsäure begleitet sein, was die Ausscheidung des Ferments in zymogener Form hervorruft. Wie oben gesagt, ist eine solche Erklärung möglich, aber schon deswegen wenig wahrscheinlich, weil die Hinzufügung großer Quantitäten von HCl zum Magensaft des Kalbes die wahre Wirkung in gewissen Grenzen erhöhen müßte, was in der Tat nicht beobachtet wird.

Einstweilen fehlen in der Literatur die Daten über die quantitativen Beziehungen von Pepsin, Chymosin und freier Salzsäure im Magensaft.

In dieser Richtung werden gegenwärtig Beobachtungen gemeinsam mit Prof. *N. Pawlowsky* angestellt, der erfolgreiche Operationen der Labmagenfistel bei neugeborenen Kälbern, 6 Stunden nach der Geburt, also vor der ersten Fütterung, ausgeführt hat. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in kurzer Zeit veröffentlicht werden. Bedeutend mehr Befunde sprechen für die Meinung, daß im Magen zwei Fermente abgesondert werden, welche zwei verschiedene proteolytische Eigenschaften besitzen. Sehr wichtig von diesen ist die Möglichkeit, eine Lösung des den Eiweißstoff gar nicht lösenden Labs und eines die Milch nicht labenden Pepsins vorzubereiten. Es gibt recht viele Methoden, die dazu dienen, im Magensaft die verdauenden oder die labenden Eigenschaften zu vernichten:

Die Fällung des Pepsins durch das Casein (3), die Behandlung mit Säuren und Alkalien (4), das Erwärmen mit Milch im Thermostaten (5) usw. Gegen die Theorie der Einheit der beiden Fermente spricht auch der Umstand, daß bei einigen Tieren im Magensaft überhaupt keine die Milch labenden Eigenschaften aufgefunden worden sind (6). Das Auffinden des Antilabs im Organismus der Tiere, welches die Gerinnung der Milch hemmt, jedoch die Wirkung des Pepsins gar nicht beeinflußt, spricht auch gegen die unitare Theorie der Fermente. Diese Antikörper sind streng spezifisch und üben ihre hemmende Wirkung nur auf das Ferment aus, durch dessen Injektion sie gewonnen sind. Das Antilab hemmt nur die Wirkung des Labferments und das Antipepsin nur die Verdauungstätigkeit des Pepsins. Außerdem sind sie spezifisch für die Fermente nur derjenigen Tiere, bei denen eine Injektion ihrer Fermente vorgenommen worden ist.

Alle diese Befunde bestärken uns in der Annahme, daß das Chymosin ein völlig selbständiges Ferment ist, welches der Magen neben dem Pepsin absondert. *Oppenheimer* (7) erkennt die Existenz des Chymosins als eigenes Ferment an, wenigstens bei neugeborenen Kälbern. Wenn man es bei den jungen Tieren anerkennt, so ist es kaum möglich, sein Vorhandensein bei den erwachsenen Tieren zu verneinen. Unerklärt erscheint nur die Rolle und die Bestimmung dieses Ferments, welches neben dem ihm verwandten Pepsin existiert. Zurzeit unterliegt es keinem Zweifel, daß das Labferment eine Protease und wahrscheinlich eine Casease ist, d. h. ein proteolytisches Ferment, welches spezifisch nur die Eiweißstoffe der Milch zersetzt und nur sehr schwach die anderen Eiweißstoffe angreift. Das erweisen die Versuche von *van Dam* (8).

Er fand, daß der Magensaft des Kalbes bei der Konzentration $H^{\cdot}$ 1×10^{-5} das Casein ebensogut verdaut, wie der Magensaft des Schweines. Indessen verdaut der erstere den Eiereiweißstoff in *Mettas* Röhrchen (0,6 mm) fast gar nicht, während der zweite ihn mit der gewöhnlichen Kraft

(5,5 mm) verdaut. Wenn man nun die Konzentration H˙ bis $2{,}7 \times 10^{-1}$ erhöht, so fällt die das Casein verdauende Kraft des Kalbsmagensaftes bedeutend (viermal), während die des Schweines gleichzeitig sich erhöht (1½ mal). Die Verdauung in *Mettas* Röhrchen dagegen bleibt bei erhöhtem Säuregehalt beinahe die gleiche (0,6 mm für den Kälbermagensaft und 5,9 mm für den Schweinemagensaft).

Wenn man also von der Einheit der beiden Fermente spricht, so ergibt sich hier ein voller Widerspruch. Bei der Einheit der Fermente müßte die das Casein verdauende Kraft beider Fermente sich in gleicher Weise verändern. Auf Grund dieser Experimente fällt auch die oben ausgesprochene Annahme, daß das Chymosin eine zymogene Form des Pepsins sei, fort. Das Chymosin besitzt also die Fähigkeit, nicht nur die Milch zur Gerinnung zu bringen, sondern auch Eiweißstoffe zu verdauen, nämlich das Casein. Das Optimum der Wirkungskraft des Chymosins liegt bei einem tieferen Säuregehalt als dasjenige des Pepsins.

Wenn die Annahme von *Michaelis* (9), daß das Chymosin und das Pepsin ein und derselbe Stoff seien, der aber in Abhängigkeit von der Reaktion der Lösung verschiedene spezifische Eigenschaften besitzt, nämlich in einer stark sauren Lösung eine peptische und in der neutralen oder schwach sauren eine nur labende, auch viele Gründe hatte, so habe ich in meinen Versuchen keine Bestätigung erbringen können, denn alle von mir geprüften (käufliche und in unserem Laboratorium aus Kalbsmägen erhaltene) Präparate des Labferments bei der Konzentration des Ferments bis 2 Proz. und der Salzsäure bis 3 Proz. haben das Hühnereiweiß nicht verdaut. Bei noch stärkerer Konzentration des Labs (bis 5 Proz.) wurde manchmal Anquellen und Durchsichtigwerden des Eiweißstoffes beobachtet, ohne seine Auflösung in den Röhrchen von *Metta*, aber erst nach dauernder Wirkung, nämlich nach 3 bis 4 Tagen. Dabei muß bemerkt werden, daß einige von den untersuchten Labpräparaten die Gerinnungskraft $^{1}/_{800\,000}$ besaßen. Wenn man auch die in *Mettas* Röhrchen wahrgenommenen Veränderungen dem Pepsin zuschreibt, so muß man anerkennen, daß die Kraft dieses Pepsins trotz des hohen Säuregehaltes im Vergleich zu der labenden Kraft zu gering ist. Die von mir den Labpräparaten parallel, unter den nämlichen Bedingungen der Konzentration des Ferments und der Säure, untersuchten Präparate des Pepsins besaßen die labende Kraft in einem weit geringeren Maße.

Als Beispiel führe ich einen meiner Versuche an, nämlich den Versuch mit einer Lösung des käuflichen Labs mit der labenden Kraft $^{1}/_{80\,000}$ und des käuflichen Pepsins. Es wurden 1proz. Lösungen beider Fermente in 50proz. Glycerin bereitet. Für die Bestimmung der Verdauung wurde in eine Reihe von Probiergläschen zu 4 ccm Milch 0,86proz. HCl eingefüllt und in das erste Probiergläschen dieselbe Menge der Lösung des Ferments zugesetzt. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden aus dem ersten Probiergläschen 4 ccm in das folgende Probiergläschen übertragen usw. In jedes Probiergläschen wurde 1 ccm von *Mettas* Röhrchen eingetragen. Die Probiergläser wurden 24 Stunden im Thermostaten bei der Temperatur von 39° gehalten. Beim Pepsin wurde noch im vierten Probiergläschen die Verdauung beobachtet, bei Lab keine, sogar im ersten Probiergläschen nicht. Zur Bestimmung der Gerinnung wurden 2 ccm derselben Lösungen der Fermente zu den 4 ccm Milch in das erste Probiergläschen hinzugefügt,

davon 2 ccm in das folgende usw.; die Probiergläschen wurden 40 Minuten bei 35° C erwärmt. Die Milch gerann bei Einführung des Labs im sechsten Probiergläschen und beim Pepsin nur im dritten. Für diese Experimente wurden Lösungen der Fermente in 50proz. Glycerin bereitet, wobei es sich ergab, daß nicht nur die Lösungen des Pepsins in Glycerin sich lange erhalten, sondern daß auch die Lösungen des Labferments sich im Verlauf von 6 Monaten nicht veränderten.

Wenn Chymosin und Pepsin identisch wären, so müßte bei den von mir gebrauchten Konzentrationen des Labs und der Säure Verdauung des Hühnereiweißes stattfinden, aber dieses wurde nicht beobachtet. Wir sehen somit, daß bedeutend mehr und gewichtigere Daten davon zeugen, daß das Chymosin ein eigenes Ferment ist, während bloß ein einziger überzeugender Grund, das gleichzeitige Vorhandensein beider Fermente im Magensaft, für die Einheit derselben spricht. Aber die Natur schafft nichts zwecklos; was ist denn der Zweck des dem Pepsin parallelen Ferments, und welche Rolle spielt es? Darüber kann man einstweilen nur einige Mutmaßungen anstellen. Es ist verständlich, daß es während des starken Wachsens der Tiere und in der Periode der Milchfütterung die Hauptrolle spielt. Wenn auch *Hammarsten* darauf hinweist, daß das Chymosin bei den neugeborenen Tieren fehlt, so haben unsere Beobachtungen (gemeinsam mit Prof. *N. Pawlowsky*) diese Angabe nicht bestätigen können. Wenigstens in bezug auf die Kälber, bei denen der vor der ersten Fütterung dem Magen entnommene Magensaft schon bedeutende Mengen des Chymosins enthält, welches nach den (noch nicht veröffentlichten) Befunden von Prof. *G. Inichoff* sich auch beim Fötus im Mutterleibe vorfindet (selbstverständlich in der zymogenen Form).

Die Resultate der Untersuchungen an den neugeborenen Kälbern werden in kurzer Zeit veröffentlicht werden. Der Kalbsmagen enthält somit Chymosin vom Moment der Geburt an und im Vergleich zum Pepsin wahrscheinlich wohl in bedeutenden Mengen. Wir wissen, daß von allen mit der Nahrung eingeführten Eiweißstoffen vom Pepsin am leichtesten der Eiweißstoff der Milch (das Casein) verdaut wird (und wahrscheinlich das Lactalbumin und das Globulin, über die in der Literatur einstweilen wohl keine Daten vorhanden sind, die jedoch Ähnlichkeit mit dem ihnen verwandten Serumalbumin vermuten lassen). In Anbetracht einer so leichten Zersetzung der Eiweißstoffe der Milch durch das Pepsin würde die in den Magen des Kalbes eingeführte Milch, seine einzige Nahrung, zu schnell aus dem Magen wieder entfernt werden; dieses würde wiederum das Bedürfnis nach öfterer Fütterung oder nach einer öfteren Aufnahme einer im Vergleich zum Volumen wenig wertvollen Nahrung hervorrufen. Das Chymosin als kaseolytisches Ferment verdaut das Casein bedeutend langsamer, wobei die Wirkung der im Kalbsmagen anwesenden nicht großen Menge

des Pepsins noch dadurch paralysiert wird, daß die Einführung von großen Mengen von Eiweißstoffen in kolloidaler Lösung teilweise die Bindung der freien HCl hervorruft, die zur Verdauung durch das Pepsin nötig ist, und der Abbau des Caseins auf diese Weise fast ausschließlich durch Chymosin vor sich geht. *Abderhalden* hat bewiesen, daß die gelösten Eiweißstoffe durch das Pepsin gar nicht verändert werden. Darauf basierend, kann man annehmen, daß die Natur solch ein Ferment schaffen mußte, welches den in der Milch löslichen Eiweißstoff in einen unlöslichen und somit der proteolytischen Zersetzung mehr zugänglichen überführte. Vielleicht verschwindet das Chymosin bei den Tieren im reiferen Alter deswegen auch nicht vollständig. Es ist auch möglich, daß beim Zersetzen der Eiweißstoffe der Milch durch das Chymosin andere (oder in anderen quantitativen Verhältnissen), dem wachsenden Organismus notwendigere Produkte erhalten werden. In der Literatur liegen einstweilen keine erschöpfenden Befunde über die Abbauprodukte des Caseins durch das Chymosin und das Pepsin (z. B. durch den Magensaft des Kalbes und des Schweines) vor. Die Unterschiede der Wirkung können nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ sein; das muß keine geringe Rolle bei der Ausnutzung der Abbauprodukte der Eiweißstoffe durch den Organismus spielen, welches nach dem bekannten „Gesetze des Minimums" (der Synthese der Eiweißstoffe aus ihren Bestandteilen durch den Organismus) vor sich geht.

Die hier ausgesprochenen Voraussetzungen sind in Anbetracht der widersprechenden Angaben der Literatur wohl möglich, doch fordern sie wie eine jede Hypothese eine experimentelle Bestätigung. Zu diesem Zwecke wird eine Reihe von experimentellen Untersuchungen vorgeschlagen, die die berührte Frage klarlegen sollen. Diese Experimente sind nach drei Richtungen beabsichtigt:

1. Einfluß des Chymosins auf die Eiweißstoffe der Milch.
2. Qualitative und quantitative Untersuchung des Magensaftes von neugeborenen Kälbern (gemeinsam mit Prof. *N. Pawlowsky*).
3. Untersuchung der Abbauprodukte des Caseins durch das Pepsin und das Chymosin.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß das Chymosin als proteolytisches (kaseolytisches) Ferment die Milch sowie das Colostrum auf gleiche Weise angreifen muß, kommen wir zu dem Schluß, daß die Angaben der Literatur über die Gerinnung des Colostrums durch das Labferment wenigstens eine Bestätigung erfordern. Das Colostrum ist ein Nahrungsmittel, welches der Organismus für die Neugeborenen aus normaler Milch bereitet, und enthält deswegen dieselben Bestandteile, die nur andere quantitative Verhältnisse aufweisen. Es ist verständlich,

daß das Ferment, welches sich im Magen des Neugeborenen befindet, für den dieses Nahrungsmittel bestimmt ist, auf letzteres dieselbe Wirkung ausüben muß wie auf die Milch, nämlich in seinem ersten Stadium labend. Nach den Angaben von *König* befindet sich im Colostrum an 4 Proz. Casein und 13 bis 14 Proz. Albumin und Globulin. Dieses Casein ist es auch, das unter dem Einfluß des Labferments aus der Lösung ausfallen muß, wenn nur in letzterer eine genügende Menge von Calcium- oder Wasserstoffionen sich befinden.

Zur Bestätigung dieser Anschauung wurden Experimente über die Wirkung des Labs auf das Colostrum gleich nach dem Kalben angestellt. Es hat sich erwiesen, daß das Colostrum aller untersuchten Kühe (9) der normalen Milch gleich gerann. Für das Experiment wurde (käufliches) Labferment $^1/_{100\,000}$ stark gebraucht. Aus ihm wurde eine $\frac{1}{2}$proz. Lösung in einer Mischung von Wasser und Glycerin bereitet. Diese Lösung wurde für alle Experimente gebraucht, wobei vor jeder Untersuchung eine Kontrolle derselben stattfand. Wie oben gezeigt, verändert sich diese Lösung im Verlauf von 6 Monaten gar nicht. Das Experiment wurde folgendermaßen angestellt: in die Probiergläser wurden 5 ccm Colostrum eingefüllt und in das erste 1 ccm der Lösung des Labferments hinzugefügt. Aus dem ersten Probiergläschen wurde nach sorgfältigem Durchmischen in das nächste 1 ccm übertragen usw. Alle Probiergläschen wurden auf eine Stunde ins Wasserbad mit der Temperatur 35° C gestellt. Gleichzeitig wurden auf dieselbe Weise Probiergläser bereitet, aber unter Hinzufügung von n/10 HCl in den in der Tabelle angegebenen Quantitäten. Die Ordnungsnummer des nach einer Stunde geronnenen Probiergläschens befindet sich in der Tabelle. Außerdem wurde die Zeit der Gerinnung bei der Temperatur 35° C untersucht, wozu Probiergläser mit Lab und Salzsäure bereitet wurden. Für die Bestimmung der Gerinnungsgeschwindigkeit war man genötigt, kleinere Mengen des Labferments und der Salzsäure zu gebrauchen, weil bei Mengen, die im ersten Experiment gebraucht wurden, das Colostrum fast momentan gerann. Die Ergebnisse der Untersuchung befinden sich in nachstehender Tabelle. Vor jedem Versuch wurde die Lösung des Chymosins kontrolliert und erwies sich als völlig konstant; seine Stärke ist $^1/_{125\,000}$.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gerinnt das Colostrum gleich vom ersten Melken gar nicht schwächer als die Milch, wobei man eine leichtere Gerinnung des Colostrums vom ersten Melken als diejenige des späteren Melkens, wie auch der Milch, beobachten kann. Dies macht sich dadurch kenntlich, daß das Colostrum schon im vierten Probiergläschen ein Gerinnsel gab, die Milch dagegen erst im dritten. Das kann man dadurch erklären, daß die Eiweißstoffe des Colostrums (Casein) schon im Körper des Tieres, vielleicht infolge der erhöhten Temperatur desselben nach dem Geburtsakte, eine bestimmte Veränderung erhalten haben, weswegen für den weiteren Abbau eine geringere Menge des Ferments genügt. Etwas ganz anderes wird bei der Untersuchung der Gerinnungszeit beobachtet: hier findet beim ersten Melken eine gewisse Verzögerung in dem Ausfallen des

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Melkzeit	Die Ordnungsnummer des geronnenen Probiergläschens				Die Gerinnungszeit in Minuten				
		5 ccm Colostrum + 1 ccm $^1/_2$proz. Labs +				5 ccm Colostrum + $^1/_2$ ccm $^1/_2$proz. Labs +				
		—	0,5 ccm $^1/_{10}$n HCl	1 ccm $^1/_{10}$n HCl	2 ccm $^1/_{10}$n HCl	—	0,1 ccm $^1/_{10}$n HCl	0,2 ccm $^1/_{10}$n HCl	0,4 ccm $^1/_{10}$n HCl	0,8 ccm $^1/_{10}$n HCl
1	19. IV.	4	5	8	14	2′31″	1′31″	1′10″	49″	46″
	20. IV.	4	5	7	13	2 30	1 30	1 06	50	40
	21. IV.	3	5	7	13	2 24	1 28	56	44	30
	22. IV.	3	4	7	13	2 02	1 20	1 00	42	25
	23. IV.	3	5	6	13	1 52	1 10	1 02	42	26
	24. IV.	3	4	7	12	1 48	1 10	1 02	41	27
	25. IV.	3	4	6	12	1 46	1 12	1 01	42	29
2	28. IV.	4	5	9	13	1 42	1 21	1 05	48	41
	29. IV.	4	5	7	13	1 50	1 30	1 12	48	39
	30. IV.	4	5	7	13	1 49	1 32	1 10	47	35
	1. V.	4	5	7	12	1 42	1 27	1 15	45	35
	2. V.	3	4	6	11	1 43	1 25	1 13	46	34
	3. V.	3	4	6	11	1 43	1 24	1 13	45	32
3	18. V.									
	morgens	3	5	8	12	1 48	1 33	1 09	49	38
	abends	4	5	7	12	1 35	1 08	40	33	21
	19. V.									
	morgens	4	5	7	12	1 45	1 29	48	32	24
	abends	4	5	7	13	1 47	1 30	59	41	30
	20. V.	4	5	7	12	1 41	1 14	51	38	26
	21. V.	3	5	7	13	1 32	1 06	50	32	22
	22. V.	3	5	6	13	1 31	1 09	53	39	24
	23. V.	3	5	6	13	1 28	1 08	51	38	21
4	11. VI.									
	mittags	4	5	7	14	1 46	1 31	1 04	48	41
	abends	4	5	7	13	1 38	1 28	1 10	54	41
	12. VI.									
	morgens	4	5	7	13	1 36	1 25	1 09	56	40
	mittags	4	5	6	12	1 35	1 22	1 11	51	38
	abends	3	5	7	12	1 38	1 23	1 02	46	32
	13. VI.	4	5	8	12	1 21	1 08	55	40	29
	14. VI.	3	5	7	12	1 24	1 12	1 00	42	29
	15. VI.	3	5	7	13	1 28	1 20	1 06	41	22
	16. VI.	3	5	7	12	1 29	1 18	1 02	40	26
Milch . . .		3	5	6	12	1 25	1 10	1 00	38	25

Niederschlags statt; und das kann man gerade durch den hemmenden Einfluß großer Mengen gelöster Eiweißstoffe (Lactoglobulin und Albumin) erklären. Diese Verzögerung verschwindet allmählich, und schon am vierten bis fünften Tage ist die Gerinnungsgeschwindigkeit des Colostrums derjenigen der Milch gleich. Die Hinzufügung von Salzsäure beeinflußt das Colostrum und die Milch wie in bezug auf die Verdünnung des Ferments, so in bezug auf die Gerinnungszeit in gleicher Weise. Wie schon oben erwähnt, wurde bei der Untersuchung des Colostrums verschiedener (aber nur gesunder) Kühe kein einziges

Mal eine Nichtgerinnung durch das Labferment beobachtet. Die von anderen Autoren beobachteten Fälle des Ausbleibens des Gerinnsels im Colostrum müssen entweder der pathologischen Milch (ein niedriger Säuregehalt usw.) oder der mangelhaften Quantität der Calciumionen zugeschrieben werden.

Literatur.

1) *Hammarsten*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 18, 1908. — 2) *Pawlow* und *Parastschuk*, ebendaselbst **42**, 415, 1904. — 3) *Hammarsten*, ebendaselbst **74**, 142, 1911. — 4) *Sawitsch*, ebendaselbst **68**, 12, 1910. — 5) *v. Dam*, ebendaselbst **64**, 316, 1910. — 6) *Ducceschi*, Arch. di Fisiol. **5**, 413, 1908. — 7) *Oppenheimer*, Die Fermente. — 8) *v. Dam*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 247, 1912. — 9) *Michaelis*, diese Zeitschr. **17**, 231, 1909.

Untersuchung einiger physikalischer Eigenschaften des alkoholhaltigen Serums.

Von

Reinhold Fürth und **Otto Blüh.**

(Aus dem Institut für theoretische Physik der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 27. Januar 1924.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

R. Fürth und *R. Keller*[1]) haben vor kurzer Zeit in dieser Zeitschrift mitgeteilt, daß geringe Alkoholmengen in beträchtlichem Maße die Dielektrizitätskonstante und die elektrolytische Leitfähigkeit erhöhen. Aus diesen zwei Beobachtungen allein war es noch nicht möglich, diese auffallende Erscheinung zu erklären, und es ergab sich als zweckmäßig, noch andere physikalische Konstanten des alkoholhaltigen Serums zu bestimmen. Die angestellten Versuche und ihre Resultate sollen im folgenden mitgeteilt werden[2]).

Es wurden vier physikalische Größen gemessen: 1. Viskosität, 2. Oberflächenspannung, 3. Brechungsquotient, 4. optisches Drehvermögen.

1. Viskosität.

Die Messungen erfolgten mit dem Viskosimeter durch Bestimmung der Ausflußzeiten τ. Die innere Reibung des Wassers gleich 1 gesetzt, erhielt man die Viskositäten η des alkoholhaltigen Serums aus der Proportion

$$\eta : \eta' = \tau : \tau'.$$

Diese relativen Viskositäten enthält Tabelle I. Die Tropfen Alkohol wurden wieder mit der in der zitierten Arbeit[1]) beschriebenen Pipette erzeugt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **141**, 187, 1923.

[2]) Betreffs der genauen Details der Messungen vgl. die demnächst erscheinende gleichlautende Arbeit von *Fürth* und *Blüh*, Kolloid-Zeitschr.

Tabelle I.

Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	η	Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	η
0	2,13	10	2,17
1	2,12	15	2,26
2	2,10	20	2,31
3	2,08	25	2,35
5	2,12	80	3,31

Abb. 1.

2. Oberflächenspannung.

Diese wurde aus dem Gewicht des aus einer starkwandigen Kapillare abfallenden Tropfens berechnet. Tabelle II enthält die Gewichte der abfallenden Tropfen und daneben die Oberflächenspannung α in absolutem Maße.

Tabelle II.

Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	Tropfengewicht	α
0	0,0776	60,5
1	0,0769	60,0
3	0,0749	58,5
5	0,0730	57,0
10	0,0701	55,1
25	0,0629	49,3
80	0,0485	37,7

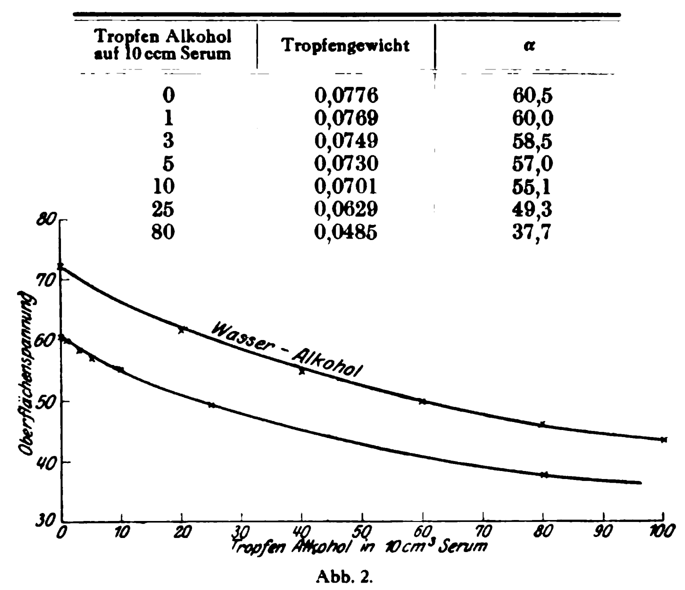


Abb. 2.

Die Oberflächenspannung nimmt bei Alkoholzusatz ständig ab. Vergleichsweise ist in Abb. 2 die Oberflächenspannung eines Wasser-Alkoholgemisches eingetragen. (Entnommen: *Landolt-Börnstein*, 5. Aufl., 1, 238.)

3. Brechungsquotient.

Der Breohungsquotient wurde mit dem *Pulfrich*schen Refraktometer bestimmt für die *D*-Linie des Natriums. Man erhielt folgende Werte (Tabelle III).

Tabelle III.

Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	n_1	n_2
0	1,3485	1,3487
1	1,3486	1,3487
3	1,3486	1,3487
4	—	1,3490
5	—	1,3492
6	1,3488	1,3492
·10	1,3492	1,3495
25	1,3503	1,3505
80	1,3539	1,3539

Abb. 3.

Die Abweichungen in den zwei Beobachtungsreihen rühren davon her, daß verschiedene Sera verwendet wurden. Man erkennt aber deutlich aus beiden Kurven ein rasches Ansteigen des Brechungsquotienten bei Zusätzen im Gebiete von 3 bis 5 Tropfen.

4. Optisches Drehvermögen.

Dieses wurde mit einem Saccharimeter in einem 5 cm langen Rohre bei weißem Lichte untersucht. Zur Beobachtung mußte wegen der geringen Durchsichtigkeit des Serums in der erwähnten Schichtdicke als Lichtquelle eine Nernstlampe verwendet werden. Es zeigten sich die folgenden, auf 1 dm Schichtdicke bezogenen Drehungen.

Tabelle IV.

Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	Dreh-vermögen	Tropfen Alkohol auf 10 ccm Serum	Dreh-vermögen
0	4,4	7	5,1
1	3,8	15	4,5
3	5,1	25	3,8

Die Kurve zeigt ein Maximum wieder in der Gegend von etwa 3 Tropfen.

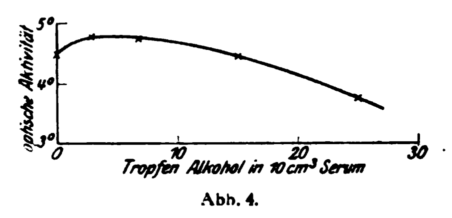


Abb. 4.

Versuch zur Erklärung der Erscheinung[1]).

Die lyophilen Kolloide und mithin die dazu gehörigen Eiweißhydrosole (Serum) sind nach den geltenden Ansichten stark hydratisiert. Jedes Teilchen ist von einer Wasserhülle umgeben (Micelle), welche ein Stabilitätsfaktor für das Teilchen ist, genau so wie seine elektrische Ladung[2]). Diese Bindung läßt sich vom Standpunkte der Dipoltheorie sehr gut verstehen. In der ersten Arbeit über diesen Gegenstand wurde schon erwähnt, daß die Eiweißmoleküle starke Dipole sind. Das Wasser ist aber gleichfalls eine Dipolflüssigkeit[3]). Das Eiweißmolekül wird also große Mengen der viel kleineren Wasserdipole an seiner Oberfläche festhalten.

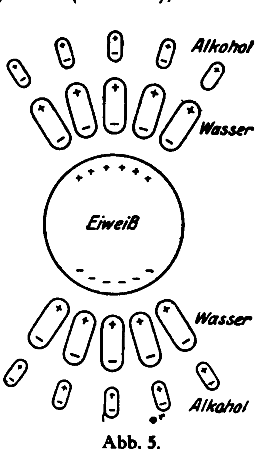


Abb. 5.

Auch die Moleküle des Alkohols sind Dipole. Kleine Mengen von Alkohol, dem Serum zugesetzt, werden sich nun so verteilen, daß sich seine Dipole außen an die freien Enden der Wasserdipole anhängen, wie es Abb. 5 zeigt.

Diese Anlagerung bedingt eine Vergrößerung des Dipolmoments, die eine Erhöhung der Dieko zur Folge hat (Abb. 1 in dieser Zeitschr. **141**, 189, 1923). Durch das Anlagern des Alkohols wird die Verbindung zwischen den verschiedenen Molekülen des Eiweißes zerstört. Die

---

[1]) Näheres vgl. *Fürth* und *Blüh*, l. c.

[2]) *Kruyt*, Kolloid-Zeitschr. **31**, 338, 1922.

[3]) Wegen der Dipole des Wassers vgl. *O. Blüh*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **104**, 363, 1923.

Folge davon ist eine Verringerung der Viskosität (Abb. 1). Erhöhung der Dieko und der letztgenannte Effekt zusammen veranlassen die Erhöhung der Leitfähigkeit (Abb. 2 in dieser Zeitschr. **141**, 191, 1923).

Zusatz größerer Quantitäten Alkohol bewirkt, daß durch ihn den Eiweißmolekülen ihre Wasserhülle entzogen wird und eine Koagulation (Denaturierung) eintritt.

Eine schöne Bestätigung der obigen Hypothese findet man im Verhalten des Brechungsquotienten. Bei kleinen Zusätzen von Alkohol wird er nicht merklich verändert; der Alkohol ist noch an die Teilchen des Eiweißes gebunden. In dem Augenblick, wo die zugesetzte Alkoholmenge den Teilchen das Wasser zu entreißen beginnt, geht der Alkohol in Lösung und beginnt die brechenden Eigenschaften des Serums zu beeinflussen. Der Verlauf der Kurve entspricht denn auch bei etwas größeren Zusätzen der linearen Mischregel: Kurve 4 geht in eine Gerade über. Daß in dem Stück zwischen 3 und 10 Tropfen der Anstieg der Kurve so steil ist, erklärt sich nun daraus, daß die Funktion die Versäumnis im ersten Teile (von 0 bis 3 Tropfen) im zweiten Teile (von 3 bis 10 Tropfen) nachholen muß, um von 10 Tropfen an wieder auf das Normal zu kommen.

Das Verhalten der Oberflächenspannung zeigt nichts Abnormales. Es handelt sich bei der Abnahme lediglich um die Mischung Wasser-Alkohol. Das Ansteigen der optischen Aktivität an denjenigen Stellen, wo eine vergrößerte Teilchenhülle angenommen wird, steht in guter Übereinstimmung mit Versuchen von *Pauli* und *Samec*[1]), welche fanden, daß die Vergrößerung der Flüssigkeitshüllen (durch Elektrolyt bewirkt) die optische Aktivität vergrößert.

Durch eine einfache Überschlagsrechnung kann man sich überzeugen, daß die kleinen Mengen beigesetzten Alkohols tatsächlich genügen, um die oben beschriebenen Effekte hervorzurufen; man findet, daß in der Gegend der extremen Wirkungen (3 Tropfen) auf jedes Molekül des Serumeiweißes 7 bis 70 Moleküle Alkohol entfallen (je nach dem zugrunde gelegten Molekulargewicht des Eiweißes).

Sehr verlockend erscheint es, die erzielten Resultate zur Deutung der physiologischen Wirkungen des Alkohols im Organismus zu verwerten. Besonders die Erhöhung der Dieko, die mit einer Veränderung der dielektrischen Leitfähigkeit und der Dissoziation der Salze in der lebenden Substanz verbunden ist[2]), und die Erniedrigung der Viskosität des Serums, die ja bekanntlich mit dem Alter zunimmt, durch

---

[1]) Diese Zeitschr. **59**, 480, 1914.

[2]) Bezüglich der Rolle, welche die Dieko der Bausteine des Organismus spielt, vgl. man die Arbeiten von *R. Keller*, Kolloid-Zeitschr. **26**, 173, 1920; **27**, 255, 1920; **29**, 193, 1921; Diese Zeitschr. **115**, 134, 1921; **128**, 409, 1921; **136**, 163, 1923; Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 388, 1921.

kleine Alkoholmengen scheint darauf hinzudeuten, daß die Zuführung kleiner Mengen Alkohol (bis zu maximal 6 Proz., bezogen auf die gegesamte Körperflüssigkeit) dem Organismus nicht nur nicht schadet, sondern sogar fördernd wirkt, während größere Mengen eine zerstörende Wirkung ausüben.

In Vorbereitung sind weitere Versuche mit anderen Alkoholen und mit Aceton, das bekanntlich ebenfalls wasserbindende Kraft besitzt und dessen Untersuchung im Hinblick auf die pathologische Bedeutung dieses Stoffes von Interesse sein dürfte.

Zusammenfassung.

Es werden in Fortsetzung früherer Untersuchungen[1]) eine Reihe von Konstanten des mit kleinen Mengen Äthylalkohol versetzten Serums, und zwar Viskosität, Oberflächenspannung, Brechungsquotient und optische Aktivität des Serums untersucht. Die beobachteten Erscheinungen werden der hydrophilen Wirkung des Alkohols zugeschrieben. Es gelingt, auf Grund der „Dipoltheorie" eine befriedigende Erklärung aller auftretenden Veränderungen zu geben. Weitere Untersuchungen werden in Aussicht gestellt.

---

[1]) *Fürth* und *Keller*, diese Zeitschr. **141**, 187, 1923.

Über den Einfluß der Röntgenbestrahlung auf die postmortale Leberautolyse.

Von

K. Hajós und **St. Hofhauser.**

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 27. Januar 1924.)

Nach *Manwaring*, *Denecke* usw. steht die Leber im Mittelpunkte der anaphylaktischen Erscheinungen beim Hunde.

Hashimoto und *Pick*, sowie *Rumpf* zeigten, daß auch beim Meerschweinchen der Leber eine große Rolle zukommt, nach ihnen ist die Leber im Sensibilisierungsprozesse beschäftigt. Auch in anderen Versuchen von *Pick* und *Hashimoto* über die postmortale Leberautolyse der sensibilisierten und anaphylaktischen Meerschweinchenleber konnte die Mitwirkung der Leber bestätigt werden. Die Auffassungen über die Rolle der Leber im anaphylaktischen Symptomenkomplex sprechen für eine in den Gewebszellen sich abspielende Reaktion des Antigens und des Antikörpers. Doch kann selbstverständlich die bekannte postmortale Steigerung der Leberautolyse nur als eine Teilerscheinung des anaphylaktischen Zustandes aufgefaßt werden, so, wie das auch unlängst von *Gottschalk* behauptet wurde.

Der eine von uns hat über die Wirkung der Röntgenbestrahlung auf die anaphylaktischen Erscheinungen berichtet. Auf Grund klinischer und experimenteller Beobachtungen wurde die durch Röntgenstrahlen vorübergehend hervorgerufene Funktionsstörung der Leber als Ursache der auf diese Weise entstandenen Desensibilisierung angesehen.

Um diese Strahlenwirkung direkt an der Leber zu beobachten, haben wir uns vorgenommen, die postmortale Leberautolyse bestrahlter Meerschweinchen näher zu verfolgen.

Über die Veränderungen der Leberautolyse liegen mehrfache Untersuchungen vor. So fanden *Pick* und *Hashimoto*, daß bei der Sensibilisierung des Leberbreies die postmortale Autolyse steigt, dagegen im anaphylaktischen Stadium des Leberbreies stark sinkt oder vollkommen gehemmt wird.

Neuerdings bestätigt *Gottschalk* die obengenannten Befunde und berichtet, von einer anderen Fragestellung ausgehend, über die Wirkung von Heteroproteineinspritzungen auf die Menge des nicht koagulablen Stickstoffs der Meerschweinchenleber. Nach *Gottschalk* beginnt 12 Stunden nach der Einspritzung von Caseosan, Typhusvaccine, Diphtherietoxin usw. in entsprechender Dosis eine Steigerung der eiweißabbauenden Zellprozesse in der Leber. Was die Strahlenwirkungen auf die Leberautolyse oder überhaupt auf die eiweißabbauenden Fermente anbelangt, so finden wir von *Bickel* die Angaben, daß das autolytische Leberferment durch die β- und γ-Strahlen des Radiums nicht geändert wird, ebenso sind die β- und γ-Strahlen des Mesothoriums, sowie Thorium X und Thoriumemanationslösung unwirksam.

Die eigenen Untersuchungen hatten nur den Zweck, zu ermitteln, ob die Röntgenstrahlenwirkung mit der Menge des nicht koagulablen Stickstoffs in irgend einem Zusammenhange steht, d. h. ob die Röntgenstrahlen unter anderem auch eine Wirkung auf die Leberzellen ausüben.

Methodik.

Zur Bestimmung des nicht koagulablen Stickstoffs bedienten wir uns der *Bang*schen Mikromethode. Durch Halsschnitt entbluteten Meerschweinchen wurde die Leber herausgenommen. Sofort nach der Entblutung, sowie nach 6 und 24 Stunden wurden aus der Leber dünne Scheiben geschnitten, auf ein *Bang*sches Löschblatt gebracht und auf der Torsionswage abgewogen. Diese Gewebsstücke haben wir 24 Stunden lang in der *Bang*schen Phosphormolybdännatriumlösung stehengelassen und die Phosphormolybdänlösung dann nach *Kjeldahl* weiter verarbeitet. Um die bakterielle Zersetzung während des Versuches zu vermeiden, wurde die Leber nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung unter Toluol gehalten. Der Stickstoff ist in Milligrammprozenten auf 100 g Lebergewebe berechnet angegeben.

Aus der Literatur sind die Normalwerte des nicht koagulablen Stickstoffs der Leber schon bekannt. *Pick* und *Hashimoto* fanden sofort nach der Entblutung 279,7 bis 299,5 mg-Proz., nach 6 Stunden 352,4 bis 358,6 mg-Proz., nach 24 Stunden 820,7 bis 922,5 mg-Proz. *Fenyvessy* und *Freund* fanden in der normalen Meerschweinchenleber zwischen 390 bis 685 mg-Proz. nicht koagulablen N. Nach *Gottschalk* schwanken die normalen Werte zwischen 220 und 370 mg-Proz. *Barát* und *Hetényi* fanden bei Kaninchen in der Leber sofort nach dem Tode 137 mg-Proz., nach 8 Stunden 167 mg-Proz., nach 24 Stunden 214 mg-Proz. Beim Menschen (8 bis 12 Stunden nach dem Exitus) fanden *Barát* und *Hetényi* beim Nierengesunden 99 bis 292 mg-Proz., *Becher* bei Pneumonie 225 mg-Proz. Reststickstoff in der Leber.

Die von uns gefundenen Normalwerte sind aus der Tabelle I ersichtlich. Tabelle II zeigt einige Stickstoffwerte während der Sensibilisierung, diese Zahlen können mit den anderen der Literatur gut in Einklang gebracht werden.

In der Tabelle III stellten wir die Resultate der Stickstoffbestimmungen der bestrahlten Meerschweinchen zusammen.

Tabelle I.

Nr.	Nicht koagulabler Stickstoff			Zunahme der Autolyse		
	sofort	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 6 Std.	zwischen 6—24 Std.	nach 24 Std.
1	152	293	534	141	241	382
2	164	276	447	112	171	283
3	186	284	434	98	150	248
4	233	313	512	80	199	279
5	179	273	524	84	251	335
6	229	304	600	75	296	371

Tabelle II.

Nr.	Art der Protein-injektion	Getötet	Nicht koagulabler Stickstoff			Zunahme der Autolyse		
			sofort	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 6 Std.	zwischen 6—24 Std.	nach 24 Std.
1	0,5 ccm Pferde-serum	10 Tage n. d. Inj.	285	322	598	37	276	313
2			264	308	621	44	313	357
3			295	562	597	267	35	302
4		3 Tage n. d. Inj.	298	567	685	269	118	387
5		14 Tage n. d. Inj.	234	419	593	185	174	359

Tabelle III.

Nr.	Größe der Röntgen-strahlendosis	Gewicht des Tieres g	Getötet n. Std.	Nicht koagulabler Stickstoff			Zunahme der Autolyse		
				sofort	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 6 Std.	zwischen 6—24 Std.	nach 24 Std.
1	5 Min., 45 cm Focusdist. 3 mm Al. Filt.	220	2	219	249	520	30	271	301
2		215	24	156	384	577	228	193	421
3		195	24	169	391	641	222	250	472
4		240	24	266	286	664	20	378	398
5	5 Min., 35 cm Focusdist. 3 mm Al. Filt.	215	18	233	429	642	196	213	409
6		220	20	397	487	712	90	225	315
7		220	24	321	515	685	194	170	364
8		290	48	230	510	664	280	154	434
9		235	24	250	442	605	192	163	355
10		250	24	225	360	724	135	364	499
11	10 Min., 35 cm Focusdist. 3 mm Al. Filt.	245	24	366	594	966	228	372	600
12	10 Min., 45 cm Focusdist. 3 mm Al. Filt.	260	24	433	634	1040	201	406	607
13	"	195	24	296	559	938	263	379	642
14	15 Min., 45 cm Focusdist. 3 mm Al. Filt.	450	24	271	462	903	191	441	632
15	"	480	24	389	576	819	187	243	430
16	"	475	24	399	599	847	200	248	448

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß die Normalstickstoffwerte der Meerschweinchenleber sofort nach dem Tode zwischen 152 und 233 mg schwanken, der Durchschnittswert 190 mg ist. Nach sechs-

stündiger Autolyse beträgt der Durchschnittswert 390 mg, nach 24 Stunden 508 mg. Dagegen zeigen die mit Röntgenstrahlen behandelten Tiere größere Unterschiede. Nach Ausscheidung der Fälle Nr. 1, 4 und 6, welche aus nicht bestimmbarem Grunde mit ihren zu niedrigen Stickstoffwerten nach sechsstündiger Autolyse mit den anderen an Zahl überwiegenden Versuchen nicht übereinstimmen, sind die Mittelwerte sofort nach der Entblutung 287 mg, nach 6 Stunden 504 mg, nach 24 Stunden 773 mg. *Aus diesen Zahlen ist es ohne weiteres zu ersehen, daß die Bestrahlung auf die eiweißabbauende Funktion der Leberzellen einen nennenswerten Einfluß hat.* Die Röntgenstrahlenwirkung kann auch auf in vitro bestrahlten Leberstücken demonstriert werden, allerdings sind hier die Unterschiede nicht so auffallend, wie das aus der Tabelle IV ersichtlich ist.

Tabelle IV.

Nr.	Nicht koagulabler Stickstoff				Größe der Strahlendosis
	sofort n. d. Tode		6 Std.	24 Std.	
1	219	bestrahlt	519	895	25 cm Focusdist. 7½ Min.
		unbestrahlt	450	869	
2	270	bestrahlt	538	908	
		unbestrahlt	430	904	
3	277	bestrahlt	475	812	35 cm Focusdist. 10 Min.
		unbestrahlt	432	791	
4	302	bestrahlt	450	879	
		unbestrahlt	375	876	

Es war nicht unser Zweck, die allgemeinen Wirkungen der Bestrahlung bezüglich des Verhaltens des Reststickstoffs im Organismus oder in den Geweben zu bestimmen. In der vorliegenden Untersuchungsreihe dachten wir nur den Beweis zu erbringen, *daß die Röntgenbestrahlung auf die Funktion der Leberzellen in irgend einer Weise verändernd wirkt, und so die anderorts ausgesprochene Annahme einer Mitbeteiligung der Leber während der Röntgenbestrahlung eine neue Stütze findet.*

Literatur.

1) *Barát-Hetényi*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **138**, H. 3/4. — 2) *Becher*, zitiert nach *Barát-Hetényi*. — 3) *Denecke*, Zeitschr. f. Immun. **20**, 501, 1914. — 4) *Gottschalk*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **96**, H. 3/5. — 5) *Hajós*, Zeitschr. f. d. allgem. exper. Med. **38**, H. 1/3, 1923. — 6) *Hashimoto* und *Pick*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **76**, H. 2, 1914. — 7) *Manwaring*, Zeitschr. f. Immun. **8**, 1911. — 8) *Pick* und *Hashimoto*, ebendaselbst **31**, 237, 1914. — 9) *Rumpf*, ebendaselbst **27**, 489. — 10) *Fenyvessy* und *Freund*, diese Zeitschr. **96**, 1919. — 11) *Bickel*, Lazarus' Handb. d. Radiumbiol. u. Therap. 1913. J. Bergmann.

Über die Bedeutung der Zellsalze für den Ablauf der avitaminösen Stoffwechselstörung.

Von

N. Hirabayashi (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 30. Januar 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In einem Versuche am Hunde hat *Tsuji* (1) den Stickstoff- und Gasstoffwechsel bei einer Nahrung untersucht, die erstens vitaminfrei und zweitens zellsalzarm war. Kochsalz erhielt das Versuchstier in genügender Menge (0,3 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht). *Tsuji* ging dabei von der Erwägung aus, daß gerade der Mangel an Zellsalzen im Verein mit demjenigen der Vitamine gewisse, der Avitaminose eigentümliche Stoffwechselstörungen verstärkt zur Anschauung bringen könnte.

Wir wissen nun über den Einfluß der Salze auf den Stoffwechsel der organischen Körpersubstanz folgendes:

Das Kochsalz bewirkt bei der Zufuhr von sehr kleinen Mengen (kochsalzarme Nahrung) eine Steigerung des N-Umsatzes; Zufuhr etwas größerer Mengen, wie sie der mundgerecht gesalzenen Nahrung entsprechen, rufen eine Einschränkung des N-Umsatzes hervor; Zufuhr noch größerer Mengen von etwa 0,6 bis 1,1 g pro Kilogramm Körpergewicht bewirken wohl wegen der dabei auftretenden Diurese eine Erhöhung des N-Umsatzes. Ein Einfluß des Kochsalzes auf die Oxydationsprozesse besteht nicht (vgl. dazu *v. Noorden*, Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels, 2. Aufl. Berlin 1906).

Über den Einfluß der Zellsalze ausschließlich des Calciums auf den Umsatz der organischen Substanz bei vitaminfreier Ernährung wissen wir aus einer Arbeit *Asadas* (2) aus dem hiesigen Laboratorium, daß die Zellsalze eine Steigerung der Oxydation und eine N-Retention verursachen können, weil bei gleicher Kochsalzzufuhr mit der Nahrung von etwa 0,36 g pro Kilogramm Körpergewicht der Ausfall der Zellsalze eine vermehrte N-Ausscheidung und eine Herabsetzung des Gaswechsels bewirkten.

Der *Tsuji*sche Hund bekam bei gleicher Grundnahrung ungefähr dieselbe Kochsalzmenge mit der Nahrung wie der *Asada*sche Hund. Der *Tsuji*sche Hund war aber im Vergleich zum *Asada*schen Hunde immer zellsalzfrei und vitaminfrei ernährt worden. Der *Tsuji*sche Hund zeigte eine allmählich zunehmende Vermehrung der N-Ausscheidung bis auf eine prämortale Periode, in der es zu N-Retentionen kam, und ebenso wie der *Asada*sche Hund in seiner zellsalzfreien Periode eine Abnahme der Oxydation.

Ich selbst (3) habe endlich einen Hund vitaminfrei mit derselben Grundnahrung, wie sie der *Asada*sche und der *Tsuji*sche Hund erhalten hatten, aber mit nur 0,15 g Zellsalzgemisch pro Kilogramm ernährt. Dieser Hund blieb bei gleichzeitiger abundanter Ernährung in einer positiven N-Bildung, bis sich sekundäre Magen- und Darmstörungen bei ihm einstellten.

Aber sowohl der *Tsuji*sche Hund, der nur mit kleineren Zellsalzmengen ernährt worden war, wie mein Hund, der die genügende Zellsalzmenge erhalten hatte, starben schließlich, und zwar nach ungefähr gleicher Zeit der avitaminösen Ernährung. Der *Tsuji*sche Hund, der bei Beginn der vitaminfreien Ernährung 10,2 kg wog, starb am 106. Tage, mein Hund, der bei Beginn der vitaminfreien Ernährung 8,2 kg wog, starb am 102. Tage.

Daraus geht schon hervor, daß ein größerer oder geringerer Gehalt der Nahrung an Zellsalzen die Krankheitsdauer bei der Avitaminose nicht beeinflußt. Das Entscheidende ist der Vitaminmangel und nicht der Zellsalzmangel.

In mehreren anderen Fällen habe ich im hiesigen Laboratorium sehen können, daß auch Hunde, besonders jüngere Tiere, trotz genügenden Kochsalz- und Zellsalzgehaltes der Nahrung, aber bei vitaminfreier Kost oft schon nach wenigen Wochen unter schweren Avitaminoseerscheinungen (Lähmungen, Augenerkrankungen, skorbutische Blutungen) zugrunde gingen.

Wenn also auch der Zellsalzmangel geeignet ist, gewisse, auch bei der Avitaminose auftretende Erscheinungen am Stoffwechsel durch gleichsinnige Wirkung zu verstärken, so wird doch durch ihn niemals das typische Gesamtbild der Avitaminose hervorgerufen, und er ist auch ohne Einfluß auf die Schnelligkeit der Entwicklung der avitaminösen Erscheinungen und des Todeseintrittes.

Tscherkess (4) gibt auf Grund seiner Versuche an Tauben an, daß bei der Entstehung der Avitaminose anorganische Elemente wie Jod, Mangan und Silicium keine Rolle spielen.

Ich fand nun bei zwei Gruppen von Tauben, die bei freiwilliger Nahrungsaufnahme das gleiche vitaminfreie Futter bekamen und von denen die erste Gruppe Kochsalz und Zellsalze, die zweite aber nur

Kochsalz in der Gewichtsmenge der gesamten Salze der ersten Gruppe erhielt, daß beide Tiergruppen eine ungefähr gleiche Lebensdauer zeigten. Es ließ sich also auch hier, genau wie wir es bei den beiden Hunden von *Tsuji* und mir sahen, kein nennenswerter lebensverkürzender Einfluß durch den Mangel an Zellsalzen feststellen. Die erste Taubengruppe (mit Zellsalz) lebte im Durchschnitt 35,4 Tage, die zweite Gruppe (ohne Zellsalz) 31,5 Tage. Die Körpergewichtsabnahme betrug, auf 100 g durchschnittliches Anfangsgewicht berechnet, bis zu dem 23. Versuchstage, nach dem die ersten Tiere in beiden Gruppen alsbald starben, bei der ersten Gruppe 39,6 Proz., bei der zweiten Gruppe 36,4 Proz.

Aus allen diesen Beobachtungen an Hunden und Tauben geht also hervor, daß die Armut der Nahrung an Zellsalzen (Ca, Mg, P, Fe, J) bei einer gleichzeitig vitaminfreien Ernährung nicht lebenskürzend wirkt. Ein größerer oder geringerer Kochsalzgehalt der Nahrung innerhalb gewisser Grenzen ist ebenfalls in dieser Hinsicht ohne Einfluß.

Umgekehrt ruft auch, wie *Suski* (5) in unserem Laboratorium zeigte, bei avitaminös ernährten Tauben, bei denen die nervösen Störungen eben beginnen sich einzustellen, eine verstärkte KCl-, $CaCl_2$-, NaCl- oder auch Harnstoffzufuhr durch intravenöse Injektion keine Beschleunigung im Ausbruch der nervösen Avitaminoseerscheinungen hervor.

Versuchsprotokolle.

Ich hatte zwei Gruppen von je fünf Tauben. Beide Gruppen bekamen Wasser und polierten Reis nach Belieben und außerdem am 22. Versuchstage noch mit dem Reis Weizeneiweiß, um die Nahrung mit N anzureichern. Die erste Gruppe wurde täglich außerdem künstlich mit Zellsalz + Kochsalz, die zweite Gruppe nur mit Kochsalz gefüttert. Die Salzfütterung machte ich folgendermaßen. Ich stellte mir Pillen nachstehender Zusammensetzung her.

a) Salzgemisch . . . . 10,0 g
Vitaminfreies Weizeneiweiß . . . . 5,0 g
Gummiarab. q. s. ut fiant pilulae Nr. 200.

b) Kochsalz . . . . 10,0 g
Vitaminfreies Weizeneiweiß . . . . 5,0 g
Gummiarab. q. s. ut fiant pilulae Nr. 200.

Das Salzgemisch für die Pillen a) bestand aus:

Kochsalz	250,0	
Calc. phosph.	100,0	
Mag. citric.	100,0	
KCl	15,0	
Ferr. citric.	30,0	
Jod pur.	0,05	in Lösung
Kal. jod.	0,1	= 5 ccm.

Den Tauben der ersten Gruppe wurden, und zwar jedem Tier pro Tag drei Pillen (a), den Tauben der zweiten Gruppe jedem Tier pro Tag drei Pillen (b) mit einer Pinzette in den Kropf eingeführt.

Von der zweiten Gruppe (Kochsalztieren) starb ein Tier an einer interkurrenten Krankheit schon nach 4 Tagen. Bei der Berechnung der Versuchsergebnisse ist dieses Tier unberücksichtigt geblieben.

Vor Beginn der Reisfütterung waren die Tauben mit Erbsen reichlich ernährt worden, so daß sie in gutem körperlichen Zustande in den Versuch kamen.

In der nachstehenden Zeichnung sind die Gewichtskurven zusammengestellt.

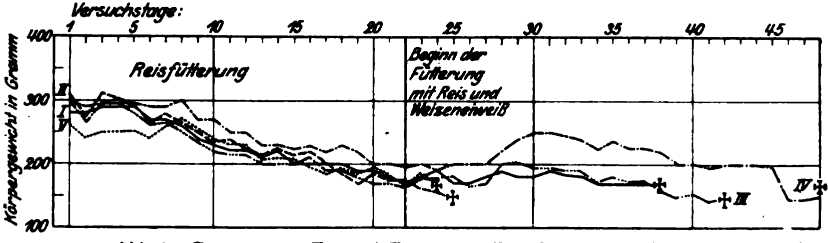


Abb. 1. Gruppe 1 pro Tag und Tier 0,075 g Zellsalz + 0,075 g Kochsalz.

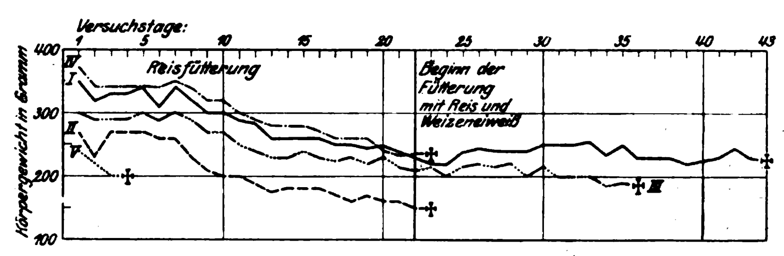


Abb. 2. Gruppe 2 pro Tag und Tier 0,15 g Kochsalz.

Literatur.

1) *Tsuji*, diese Zeitschr. **129**, 1922. — 2) *Asada*, ebendaselbst **140**, 1923. — 3) *Hirabayashi*, ebendaselbst 1924. — 4) *Tscherkess*, ebendaselbst **188**, 1922. — 5) *Suski*, ebendaselbst **198**, 1922.

Über die lipolytische Theorie der Immunhämolyse.

Von

R. Brinkman und **A. v. Szent-Györgyi.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 31. Januar 1924.)

Vorliegende kleine Mitteilung nimmt ihren Ausgangspunkt aus unseren Studien über die chemische Genese der perniziösen (1) Anämien und hat die Frage zum Gegenstande, ob die Immunhämolyse als eine Lipolyse aufgefaßt werden kann in dem Sinne, daß durch die fermentative Wirkung der Immunkörper Fette oder Phosphatide unter Freikommen von Fettsäuren gespalten werden, die dann durch ihre bekannte hämolytische Wirkung die Lyse der roten Blutkörperchen bedingen.

Die direkte Anregung zu dieser kleinen Arbeit gab einerseits der Umstand, daß in der letzten Zeit Beobachtungen mitgeteilt wurden, die eine derartige Theorie stützen könnten, und uns andererseits eine Methode zum quantitativen Nachweis freier Fettsäuren zur Verfügung stand, die, den bisherigen Methoden weit überlegen, schon sehr geringe Spuren freier Fettsäuren mit Sicherheit erkennen ließ. Unsere Aufmerksamkeit auf die freien Fettsäuren wurde durch unsere Perniciosastudien gelenkt, die uns dann auch den Anlaß gaben, die genannte Fettsäurebestimmungsmethode unter Mitwirkung von *T. Tominaga* (2) auszuarbeiten.

Die lipolytische Theorie der Immunhämolyse nimmt ihren Ausgangspunkt aus den Arbeiten von *C. Neuberg* und *C. Reicher* (3), die bei Immunseren gegenüber Lecithin und Rizinusöl eine relativ hohe lipolytische Aktivität fanden.

Eine wesentliche Stütze erfuhr die Theorie in letzter Zeit durch die Mitteilung von *J. W. Jobling* und *C. G. Bull* (4), die bei der Immunisierung ebenfalls eine erhöhte lipolytische Fähigkeit im Serum fanden, die durch Titration mit n/10 NaOH nachgewiesen wurde. Besonders starke Säureproduktion wurde erhalten, wenn dem Immunserum die homologen Blutkörperchen zugesetzt wurden. Diese Wirkung war weitgehend von der Aktivität des Komplementes abhängig. Nachdem die produzierte und

durch Titration nachgewiesene Säure durch Äther ausschüttelbar war, ist die am naheliegendste Deutung der Versuche die, daß unter Einwirkung der Immunsera Lipoide unter Freikommen von Fettsäuren gespalten wurden.

In letzter Zeit fanden *O. Olsen* und *K. Goette* (5) eine weitgehende Analogie zwischen normaler tri- und mono-butyrinspaltender Blutlipase und dem Endstück des Komplements überall, wo Endstück, auch Lipase, die auch in ihrer Wirksamkeit eine Parallele zeigen. Das Komplement-Endstück sei also die butyrinspaltende Lipase, die durch den Amboceptor und das Mittelstück an die Lipoide der antigenen roten Blutkörperchen — ihr Substrat — gebunden wird.

Die angewandte Fettsäurebestimmungsmethode wird gleichzeitig in dieser Zeitschrift mitgeteilt. An dieser Stelle sei über dieselbe also nur so viel angegeben, daß sie die quantitative Bestimmung der hohen Fettsäuren mit einem additiven Fehler von 0,0002 g, also 0,0000008 Mol. gestattet. Diese Methode ist also der titrimetrischen, besonders in Gegenwart von Eiweißstoffen, sehr weitgehend überlegen. Wäre also die Aciditätszunahme in den obigen Versuchen durch das Freikommen von höheren Fettsäuren bedingt (und stark hämolytisch wirken nur die höheren Fettsäuren), so hätten wir diese sicher nachweisen können, entsprechen doch die von *Jobling* und *Bull* als Unterschied gefundenen 0,9 ccm NaOH = etwa 0,250 mg Fettsäure.

Unsere Versuche waren folgendermaßen angestellt:

Schafblut wird mit Ringer dreimal gründlich gewaschen. Die scharf abzentrifugierten Blutkörperchen werden mit Ringer auf das doppelte Volumen verdünnt, also auf ungefähr zwei Drittel des ursprünglichen Blutvolumens gebracht. Je 10 ccm dieser Suspension werden mit 0,2 ccm Amboceptor (doppelter Grenztiter) versetzt und tüchtig durchgeschüttelt, dann $^1/_4$ Stunde im Wasserbade von 37° belassen. Nun wird zu 10 ccm der sensibilisierten Blutkörperchen 1 ccm Komplement zugesetzt[1]) und die Mischung 1 Stunde lang ins Wasserbad gesetzt. Dann werden nochmals 0,5 ccm Komplement zugesetzt und eine weitere Stunde bebrütet. Dann wird die Mischung in Aceton ausgegossen und die Fettsäurebestimmung vorgenommen. Zur Kontrolle werden 10 ccm sensibilisierter Blutkörperchen und 1,5 ccm Komplement gesondert bebrütet und dann isoliert in dasselbe Aceton eingegossen. Es werden je zwei von den genannten Versuchen parallel ausgeführt.

Die Fettsäurebestimmung ergab die folgenden Werte (Zahlen bedeuten gefundene Fettsäure in Milligrammen in 10 ccm Blut.)

	Versuch	Kontrolle
Versuch 1	1,0	1,1
Versuch 2	1,2	1,3
Mittelwert	1,1	1,2

[1]) 0,1 ccm sensibilisierter Blutkörperchen wird in 1 ccm Ringer durch 0,006 ccm des Komplementes in $^1/_4$ Stunde komplett hämolysiert.

Das Resultat war also vollkommen negativ. Ein zweiter, in ähnlicher Weise angestellter Versuch ergab dasselbe negative Resultat. Hier wurde im Hämolyseversuche ebenfalls 1,1, in der Kontrolle 1,2 mg gefunden[1]).

Nun versuchten wir uns über die Richtigkeit der Theorie von *Olsen* und *Goette* zu überzeugen. Die Identität der Blutlipase mit dem Komplement wäre allerdings eine starke Stütze der Fermenttheorie, trotz des negativen Ausfalles der chemischen Versuche. Die von *Olsen* und *Goette* angeführten Beweise sind keine direkten, und die Schlußfolgerung stützt sich nur auf eine Parallele.

Die Frage war für uns um so interessanter, da wir anläßlich unserer Studien über die Genese der perniziösen Anämie Gelegenheit hatten, uns eingehender mit der Blutlipase zu beschäftigen. Diese Versuche, die a. a. O. eingehender beschrieben werden, brachten uns zu der Überzeugung, daß im normalen Blute keine Lipase für höhere Fette und Phosphatide zirkuliert, andererseits die butyrinspaltende Lipase die Verbindungen höherer Fettsäuren nicht spaltet. Es hätte sich aber im Sinne der *Olsen-Goette*schen Theorie denken lassen, daß die Butyrase eben erst durch den Amboceptor und das Mittelstück an ihr Substrat, Fette oder Phosphatide gebunden werde. Hierüber wurde folgender Versuch angestellt.

10 ccm scharf abzentrifugierte, dreimal mit Ringer gründlich gewaschene Schafblutkörperchen werden durch 0,4 ccm Amboceptor (Titer 2,000) sensibilisiert. Dann werden 3 ccm Komplement (frisches Caviaserum) zugegeben. Nach 5 Minuten Bebrütung im Wasserbade wird scharf abzentrifugiert. Die obenstehende klare Flüssigkeit wird abpipettiert und parallel mit unbehandeltem Komplement auf hämolytische und lipolytische Kraft geprüft.

Hämolyse: Von 1 ccm Komplement wird eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen $\frac{1}{2}$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$ usw. angefertigt. Auf 1 ccm verdünnten Komplements wird 0,1 ccm sensibilisierter Blutkörperchen gegeben. Resultat nach 15 Minuten bei 37°:

	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$
Komplement (unbeh.) .	+	+	+	(±)	—	—
Komplement (n. Komplementablenkungsversuch)	—	—	—	—	—	—

Das + -Zeichen bedeutet komplette, das (±) deutliche, aber inkomplette Hämolyse.

Aus diesem Versuch geht also hervor, daß das Komplement, das sonst eine starke Wirksamkeit zeigte, durch die sensibilisierten Blutkörperchen vollkommen abgelenkt und beim Abzentrifugieren der Flüssigkeit entzogen wurde.

Die butyrinspaltende Kraft wurde folgendermaßen geprüft: Zu 1 ccm Serum werden 2 ccm 2proz. Monobutyrin in Aqua dest. und 0,2 ccm 10proz.

---

[1]) Zur kompletten Hämolyse (in isotonischer Phosphatlösung) von 10 ccm 50proz. Blutkörperchen sind bei künstlicher Zufügung 10 mg Ölsäure nötig.

NaCl gegeben. Hiervon wird 1 ccm mit n/10 NaOH titriert (Indikator Phenolphthalein) und der Rest bei 37° 2,5 Stunden bebrütet. Hiernach wird nochmals 1 ccm titriert. Als Kontrolle dient 1 ccm Serum mit 2 ccm Aqua dest. und 0,2 ccm NaCl, und andererseits 2 ccm Butyrin mit 0,2 ccm NaCl und 1 ccm Ringer. Die Zahlen bedeuten den Unterschied der verbrauchten Menge von n/10 NaOH vor und nach der Inkubation.

	Versuch	Kontrolle 1	Kontrolle 2
Serum unbehandelt	0,32	0	0
Serum n. Komplementablenkung	0,38	0	0

Wir finden also trotz vollkommener Komplementablenkung eine ungeschwächte lipolytische Kraft. Das Komplement kann also nicht mit der Lipase identisch sein.

Es schien uns endlich in bezug auf die Theorie der Immunhämolyse nicht ganz ohne Interesse, unserer Arbeit noch einige Versuche mit Reversion der Hämolyse anzuschließen. Wie a. a. O. beschrieben wurde (6), läßt sich bei der Fettsäure und der Hypotoniehämolyse das freigemachte Hämoglobin wieder an die Stromata binden, wenn man mit isotonischer Salzlösung verdünnt.

Es wurden also dreimal mit Ringer gewaschene Schafblutkörperchen mit destilliertem Wasser komplett hämolysiert und zum hämolysierten Blut eine Menge 10proz. NaCl zugegeben, die zur Wiederherstellung der Isotonie nötig war, worauf die Reversion der Hämolyse eintritt. Mit diesen revertierten Blutkörperchen wurde nun in üblicher Weise die Immunhämolyse ausgeführt. Hierbei zeigte sich, daß die revertierten Blutkörperchen sich in derselben Weise betragen, wie normale, vorher unhämolysierte Blutkörperchen, d. h. durch isolierten zugefügten Amboceptor oder Komplement nicht angegriffen werden, jedoch durch Amboceptor plus Komplement glatt aufgelöst werden.

Es schien uns auch interessant, zu untersuchen, ob nach der Immunhämolyse bei Verdünnung mit einer Salzlösung eine Reversion möglich sei, wie dies wohl bei einer Reihe anderer Arten von Hämolysen der Fall ist, wie es a. a. O beschrieben wurde (6).

Um bei diesem Versuche eine über die Chromolyse ausgehende Hämolyse auszuschließen, wurde der Vorgang der Hämolyse unter Messen des elektrischen Widerstandes verfolgt und kontrolliert. Der Versuch wurde derart angestellt, daß mit Amboceptor sensibilisierte Blutkörperchen stufenweise mit stets mehr und mehr Komplement versetzt wurden, bis komplette Hämolyse eintrat. Gleichzeitig wurde der elektrische Widerstand der Blutkörperchensuspension und hierdurch auch der der Blutkörperchen gemessen. Hierbei beobachteten wir während der Hämolyse das durch *Stewart* beschriebene langsame Steigen des elektrischen Widerstandes der Blutkörperchen. War die komplette Hämolyse bei stets gesteigertem Widerstande eingetreten, so wurde die Blutkörperchensuspension dem Wasserbade entnommen und der Reversionsversuch durch Verdünnen mit Kochsalzlösung angestellt. Der gesteigerte elektrische Widerstand versicherte uns, daß die Hämolyse nicht über die Chromolyse hinausgegangen war. Trotzdem zeigte sich aber, daß bei dem derart hämolysierten Blute keine Reversion auszulösen war, so daß wir vorläufig annehmen müssen, daß nach der Immunhämolyse keine Reversion möglich ist.

Zum Schlusse sei noch folgenden kleinen Versuchs Erwähnung getan: Dreimal mit Ringer gewaschene Blutkörperchen werden mit destilliertem Wasser hämolysiert. Zu einem Teil des hämolysierten Blutes wird Amboceptor vom doppelten Grenztiter zugefügt. Zur zweiten Portion kommt Komplement des doppelten Endtiters. Zum dritten Teil kommt Amboceptor plus Komplement. Nach einer Viertelstunde Inkubation wird mit allen drei Portionen die Reversion ausgeführt. Portion I und II geben normale Reversion. In Röhre III kommt keine Reversion. Parallele Versuche ergeben das gleiche Resultat, so daß geschlossen werden kann, daß das System Amboceptor plus Komplement auch dann zu wirken imstande ist, wenn Stroma und Hämoglobin getrennt sind, und zur Entfaltung der hämolytischen Wirkung keine Verbindung des Hämoglobins mit dem Stroma nötig sei. Ob das immunhämolytische System seine Wirkung auf die Stromata oder auf das Hämoglobin ausübt, sei der Gegenstand späterer Untersuchungen.

Zusammenfassung.

1. Es wird in vorliegender Arbeit mit Hilfe einer besonders genauen direkten chemischen Methode die Frage untersucht, ob bei der Immunhämolyse höhere Fettsäuren aus ihren chemischen Verbindungen freigemacht werden. Es konnte bei der Immunhämolyse kein Freikommen von höheren Fettsäuren nachgewiesen werden.

Anläßlich dieser Arbeit wurden noch folgende Befunde erhoben:

2. Nach vollständiger Komplementablenkung ist die lipolytische Kraft des Serums Monobutyrin gegenüber ungeschwächt erhalten. Die Blutlipase kann also mit dem Komplement nicht identisch sein.

3. Immunhämolyse kann ebensogut an revertierten, wie an normalen Blutkörperchen ausgeführt werden, hingegen ist nach Immunhämolyse keine Reversion möglich.

4. Das System Amboceptor plus Komplement ist auch dann imstande, seine Wirkung zu entfalten, wenn Stromata und Hämoglobin durch Hypotoniehämolyse voneinander getrennt sind.

Literatur.

1) *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi*, Proc. Roy. Acad. Amsterdam **26**, 470, 1923. — 2) *A. Szent-Györgyi* und *Tyuzi Tominaga*, diese Zeitschr. 1924. — 3) *C. Neuberg* und *C. Reicher*, ebendaselbst **11**, 400, 1908; Münch. med. Wochenschr. 1907, S. 1725. — 4) *J. W. Jobling* and *C. G. Bull*, Journ. exper. Med. **16**, 483, 1912. — 5) *O. Olsen* und *K. Goette*, diese Zeitschr. **112**, 188, 1920. — 6) *R. Brinkman* and *A. v. Szent-Györgyi*, Journ. of Physiol. **58**, 204, 1923.

Versuche über die anaphylaktogene Wirkung kristalloider Substanzen.

I. Mitteilung: Über Atoxylüberempfindlichkeit.

Von

Kurt Meyer und **M. E. Alexander** (Waterbury, Conn.).

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Die Bemühungen, auf experimentellem Wege einen Einblick in das Wesen der Idiosynkrasien zu gewinnen, werden am ehesten auf Erfolge rechnen dürfen, wenn sie zunächst die Aufklärung der *erworbenen* Überempfindlichkeiten gegen Substanzen von *bekannter chemischer Struktur*, also das Gebiet der Arzneiüberempfindlichkeitszustände, in Angriff nehmen. Hier dürften die Entstehungsbedingungen leichter experimentell zu prüfen sein als etwa bei den angeborenen Nahrungsmittelidiosynkrasien.

Die Aufschlüsse, die die experimentelle Forschung auf dem Gebiete der Eiweißüberempfindlichkeit gewann, eröffnete auch Ausblicke auf ein Verständnis der Arzneiüberempfindlichkeit. Es war *Wolff-Eisner*[1]), der zuerst beide Erscheinungen in Beziehung zueinander setzte. Auf die Versuche von *Obermayer* und *Pick* über Strukturspezifität sich stützend, nahm er zur Erklärung der Jodüberempfindlichkeit an, daß das Jod bei seinem Eintritt in den Organismus mit den Eiweißkörpern unter Bildung von Jodeiweißkörpern reagiere und daß diese, in ihrer Struktur dem Organismus entfremdet, wie artfremdes Eiweiß eine Jodeiweißüberempfindlichkeit erzeugen, so daß dem Organismus von neuem zugeführtes Jod, wieder über dem Wege der Jodeiweißbildung, die bekannten Symptome der Eiweißvergiftung hervorrufen kann.

Die anaphylaktische Natur der Arzneiüberempfindlichkeit suchten dann verschiedene Forscher durch *passive* Übertragung des Zustandes mit dem Serum auf Meerschweinchen nachzuweisen. *Friedberger* und *Ito*[2]) glaubten auch direkt beim Meerschweinchen eine *aktive* Jodüberempfindlichkeit erzeugt zu haben. Aber die Ergebnisse aller dieser Versuche wirken nicht sehr überzeugend, wenn man sie mit der Regelmäßigkeit und Eindeutigkeit der Resultate bei der Eiweißüberempfindlichkeit vergleicht.

Ganz für sich steht die Angabe von *H. Curschmann*[3]), daß es gelingt, beim Meerschweinchen mit Ursol (Chinondiimin) typische Anaphylaxie

---

[1]) *A. Wolff-Eisner*, Dermatol. Centralbl. **10**, 164, 1907.

[2]) *E. Friedberger* und *T. Ito*, Zeitschr. f. Immunitätsf. **12**, 241, 1912.

[3]) *H. Curschmann*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 195.

zu erzeugen, womit eine Erklärung für die Genese des Ursolasthmas der Pelzfärber gegeben wäre.

Das Gebiet der Strukturspezifität der Eiweißkomplexverbindungen ist durch die wichtigen Arbeiten von *Landsteiner* und seinen Mitarbeitern[1]) in den letzten Jahren mit so großem Erfolge bearbeitet worden, daß uns eine weitere Verfolgung des von *Wolff-Eisner* gewiesenen Weges Aussicht auf einen Einblick in das Wesen der Arzneiüberempfindlichkeiten zu bieten schien. *Landsteiner* zeigte, daß bei der Kuppelung von Eiweiß mit verschiedenen chemischen Substanzen — die interessantesten Ergebnisse wurden mit Diazoverbindungen erzielt — diese dem Komplex seinen antigenen Charakter aufprägen. Mit ihm erzeugte Antikörper (Präzipitine) reagieren daher mit allen Eiweißverbindungen, die die gleiche chemische Gruppe enthalten, unabhängig von der Natur der Eiweißkomponente, während eine Reaktion mit dem zur Kuppelung benutzten nativen Eiweiß nicht oder nur in abgeschwächtem Maße erfolgt. *Landsteiner* konnte dann weiter noch wahrscheinlich machen, daß die Antikörper auch mit den einfachen chemischen Substanzen, von denen bei der Herstellung der Diazoverbindungen ausgegangen war, reagierten; zwar geben diese keine Fällung mit den Antikörpern, aber sie scheinen das Phänomen der „spezifischen Hemmung" zu bieten. Jedenfalls geht aus den Versuchen *Landsteiners* hervor, daß einfache chemische Substanzen durch Kuppelung an Eiweiß auf sie spezifisch eingestellte Antikörper erzeugen können.

Wir stellten uns nun die Frage, ob es gelingt, auf demselben Wege eine spezifische Überempfindlichkeit gegen einfache chemische Substanzen oder wenigstens gegen Verbindungen solcher Substanzen mit Eiweiß experimentell zu erzeugen. Wir gingen aus von Metanilsäure und p-Arsanilsäure (Atoxyl), die nach den Vorschriften *Landsteiners* als Diazoverbindungen mit Pferdeserum und Hammelserum gekuppelt wurden.

Die ersten Versuche betreffen *aktive* Sensibilisierung. Meerschweinchen von 240 bis 300 g Gewicht erhielten intraperitoneal 1 ccm einer 1 proz. Lösung der Pferdeserumverbindungen. Die Prüfung auf Anaphylaxie erfolgte nach 4 Wochen.

Die Versuche mit *Metanilsäure* müssen ausscheiden. Zwar war Anaphylaxie gegen die zur Vorbehandlung benutzte Metanilsäure-Pferdeserumverbindung ohne weiteres nachweisbar. Dagegen ließ sich das Verhalten gegen Metanilsäure selbst und gegen die Metanilsäure-Hammelserumverbindung nicht genauer feststellen, da diese bei intravenöser Injektion schon an sich bei Kontrolltieren zu stark toxisch wirkten.

In der *Atoxyl*-Versuchsreihe wurde festgestellt, daß noch 0,1 ccm der zur Vorbehandlung benutzten Lösung bei intravenöser Injektion akut (3 Minuten) tödlich wirkte. Weiter ergab sich, daß Atoxyl selbst in einer Menge von 0,05 g nicht die geringsten Erscheinungen hervorrief, während 0,1 g auch bei Normaltieren bereits toxisch wirkte. Zwei vorbehandelte Meerschweinchen, die 0,05 g Atoxyl intravenös erhalten hatten, reagierten am nächsten Tage auf intravenöse Injektion von 0,2 ccm Atoxyl-Pferdeserum mit akut tödlichem anaphylaktischen Anfall, das Atoxyl hatte also keine Antianaphylaxie erzeugt. Die Prüfung mit Atoxyl-Hammelserum ergab nicht ganz klare Resultate. Während ein Tier nach Injektion von

[1]) *Karl Landsteiner* und *H. Lampl*, diese Zeitschr. **86**, 343, 1918; *Karl Landsteiner*, ebendaselbst **98**. 106. 1919.

1 ccm zwar schwer krank und gelähmt war, aber keine Krämpfe und keinen Temperatursturz (37°) zeigte, reagierte ein zweites auf Injektion von 0,5 ccm mit Krämpfen und Temperaturabfall auf 36,1°, blieb aber am Leben. Für weitere Versuche standen in dieser Serie keine Tiere mehr zur Verfügung.

Die Versuchsreihe zeigt, daß die *Atoxyl-Eiweißverbindung anaphylaktogene Eigenschaften besitzt, daß sie aber nur Überempfindlichkeit gegen sich selbst, nicht gegen reines Atoxyl erzeugt.* Das Atoxyl scheint mit den anaphylaktischen Antikörpern überhaupt nicht in Reaktion zu treten, da sonst eine Desensibilisierung zu erwarten gewesen wäre. Die Frage der Strukturspezifität der Anaphylaxie, d. h. ob sie sich auf andere Atoxyl-Eiweißverbindungen erstreckt, ließ sich nicht mit Sicherheit entscheiden.

In dieser Beziehung lieferten nun weitere Versuche über *passive Anaphylaxie* ganz eindeutige Ergebnisse. Ein Kaninchen erhielt in fünftägigen Abständen je 5 ccm der Atoxyl-Pferdeserumverbindung intraperitoneal. Das 10 Tage nach der letzten Injektion entnommene Serum wurde Meerschweinchen, nach Vorversuchen zur Feststellung der geeigneten Dosis, in einer Menge von 3 ccm intraperitoneal injiziert. Die Prüfung auf Anaphylaxie geschah am folgenden Tage. Einige Versuche sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Zunächst ergab sich auch hier, daß eine Überempfindlichkeit gegen reines Atoxyl nicht eingetreten war. Was die Empfindlichkeit gegen die zur Vorbehandlung benutzte Atoxyl-Pferdeserumverbindung betrifft, so rief diese in einer Menge von 0,1 ccm akuten Tod, bei 0,05 ccm noch deutliche anaphylaktische Erscheinungen hervor. Das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Reihe aber ist, daß die *Atoxyl-Hammelserumverbindung anscheinend ebenso toxisch wirkte wie die Pferdeserumverbindung*; wenigstens bewirkten auch von ihr 0,1 ccm akuten Tod, während allerdings die größere Dosis von 0,2 ccm nur schwerste anaphylaktische Symptome auslöste. Injektion von Atoxyl selbst bewirkte auch hier keine Herabsetzung der Empfindlichkeit gegen die Pferdeserumverbindung.

Tabelle I. Alle Tiere mit 3 ccm Serum eines mit Atoxyl-Pferdeserumverbindung immunisierten Kaninchens intraperitoneal vorbehandelt.

Nr.	Gewicht g	Nach 24 Stunden intravenöse Injektion von	Ergebnis
24	250	0,2 ccm Atoxyl-Pferdeserumverbindung	† nach 3′
25	240	0,1 " " "	† nach 1′
26	250	0,05 " " "	krank, 35,7°, überlebt
27	245	0,5 " Atoxyl-Hammelserumverbindung	† nach 3′
28	250	0,2 " " "	Schwerster Anfall, 39,4°, überlebt
29	240	0,1 " " "	† nach 5′
30	245	0,05 " " "	keine Symptome
36	250	0,05 g Atoxyl	keine Symptome
		Nach 4 Stunden 0,2 ccm Atoxyl-Pferdeserumverbindung	† nach 5′
37	240	0,05 g Atoxyl	keine Symptome
		Nach 24 Stunden 0,2 ccm Atoxil-Pferdeserumverbindung	† nach 3′

Die Ergebnisse der Versuche mit passiver Anaphylaxie ergänzen somit in erwünschter Weise die bei der aktiven Anaphylaxie erhaltenen Resultate. *Sie zeigen eindeutig, daß die mit der komplexen Atoxyl-Eiweißverbindung erzeugte Anaphylaxie strukturspezifischen Charakter hat*, d. h. nicht die Eiweißkomponente ist es, die den Eintritt der Reaktion vermittelt, sondern die Atoxylgruppe. Man wird diesen Zustand daher als *Atoxylüberempfindlichkeit* bezeichnen dürfen.

Wenn das Atoxyl selbst keine Erscheinungen auslöst, so kann das mehrere Gründe haben. Einmal wäre zu prüfen, ob nicht etwa das diazotierte Atoxyl, das ja eigentlich an das Eiweiß gekuppelt ist, wirksamer ist. Sodann wäre es möglich, wie schon *Landsteiner* angedeutet hat, daß eine gewisse Größe des Moleküls Bedingung ist, damit entweder überhaupt die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper erfolgt oder doch zu den bekannten anaphylaktischen Erscheinungen führt.

Inwieweit der Nachweis, daß chemisch einfache kristalloide Substanzen auf dem Wege der Kuppelung an Eiweiß spezifisch anaphylaktogen wirken, zur Erklärung der Arzneiüberempfindlichkeiten beitragen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Besonders wird zu prüfen sein, ob nicht noch lockerere Bindungen zur Hervorbringung einer solchen Wirkung genügen, da man im Organismus, besonders für die kurze Zeit zwischen Reinjektion und Auslösung des Anfalls, wohl nur mit losen Komplexbildungen wird rechnen können.

Als unsere Versuche abgeschlossen waren, ersahen wir aus einem Referat in den Abstracts of Bacteriol. (7, 253, 1923), daß *Landsteiner* selbst inzwischen an uns nicht zugänglicher Stelle (Verhandl. Koningl. Akad. d. Wetenschap. Amsterdam 25, 34, 1922) Versuche über Anaphylaxie mit Arsanilsäureazoproteinen mitgeteilt hat. Unsere Versuchsergebnisse scheinen sich im wesentlichen mit den seinen zu decken. Nur scheint er Desensibilisierung durch Atoxyl-Tyrosin, also eine relativ einfache Verbindung, beobachtet zu haben.

Zusammenfassung.

Meerschweinchen, die mit einer Verbindung von Pferdeserum und diazotiertem Atoxyl aktiv oder mit dem Serum eines mit der gleichen Verbindung immunisierten Kaninchens passiv vorbehandelt sind, erweisen sich als anaphylaktisch gegen diese Verbindung. Die Überempfindlichkeit ist strukturspezifisch, d. h. sie besteht auch gegenüber einer Atoxyl-Hammelserumverbindung und kann daher verallgemeinernd als eine *Atoxylüberempfindlichkeit* bezeichnet werden. Allerdings löst Atoxyl selbst keine anaphylaktischen Erscheinungen aus und wirkt auch nicht desensibilisierend. Nur auf dem Wege über die Kuppelung an Eiweiß hat es also sowohl anaphylaktogene wie Anaphylaxie auslösende Wirkung.

Zur Kenntnis der Alkoxylgruppen des Holzes und des Lignins von Fichte.

Von

Erik Hägglund und **Bror Sundroos.**

(Aus dem Institut für Holzchemie der Akademie zu Åbo, Finnland.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Die Tatsache, daß durch Trockendestillation oder alkalischen bzw. sauren Aufschluß von Holz Methylalkohol entsteht, wurde schon längst als Beweis für die Anwesenheit von Methoxylgruppen in den Holzbestandteilen angesehen. Später ist erkannt worden, daß eigentlich nur das Lignin Träger von Alkoxylgruppen ist. Mit siedender Jodwasserstoffsäure entstehen aus Lignin Alkyljodide, deren Menge, als Methoxyl berechnet, etwa 14 Proz. des Ligningewichtes ausmacht. Ob nun tatsächlich die überdestillierenden Alkyljodide nur aus Methyljodid bestehen oder etwa eine Mischung von verschiedenen Alkyljodiden sind, wurde bis jetzt nicht untersucht. *Heuser* und *Schmelz*[1]) behaupten wohl, daß es ihnen gelungen ist, durch Hydrolyse von Lignin mit verdünnter Salzsäure eine quantitative Ausbeute von Methylalkohol zu gewinnen; aber unter den angegebenen Bedingungen war es uns nicht möglich, mehr als 2 Proz. Methylalkohol statt etwa 15 Proz. zu erhalten[2]). Bei der Verzuckerung von Holz mit hochkonzentrierter Salzsäure wird ein Ligninrückstand gewonnen, der fast alles im Holz vorhandene Alkoxyl, als Methoxyl berechnet, enthält[3]). Ein kleiner Teil der Alkoxylgruppen wird abgespalten und kann in der salzsauren Zuckerlösung nachgewiesen werden (*Färber*). Die festgestellte Menge Methylalkohol betrug höchstens, auf das Holzgewicht bezogen, 0,64 Proz.

Bei der Sulfitzellstoffkochung werden ebenfalls geringe Mengen von Methylalkohol erhalten. *Bergström*[4]) gibt an 7 kg auf die Tonne Zellstoff, was rund 3,5 kg auf 1000 kg Holz entspricht, d. h. 0,35 Proz. Bei der Natron-

[1]) Cellulosechemie 1, 49, 1920.

[2]) Die Untersuchung verdanke ich meinem Mitarbeiter, Herrn Dr. *Eduard Färber*.

[3]) Vgl. *Hägglund*, Arkiv f. Kemi 7, Nr. 8, 1918.

[4]) Svensk Papperstidning **1914**, H. 10, S. 116.

zellstoffkochung werden etwas größere Mengen von Methylalkohol gewonnen, und zwar nach *Bergström* und *Fagerlind*[1]) 13 kg auf die Tonne Zellstoff oder etwa 0,5 Proz. auf Holz (Nadelholz) bezogen. Bei der Holzverkohlung erhält man aus Nadelholz etwa 0,9 Proz. Methylalkohol. Die Ausbeute kann durch Zusätze (z. B. von Alkali) etwas erhöht werden. In den oben erwähnten Fällen ist Methylalkohol tatsächlich nachgewiesen. Die Ausbeuten bewegen sich in den Grenzen zwischen 8 bis 25 Proz. der theoretischen Menge.

Wie ich kürzlich nachgewiesen habe, ist es möglich, die hydrolytische Abspaltung der Alkoxylgruppen wesentlich weiter zu treiben, und zwar durch Druckerhitzung der sogenannten Schwarzlauge, d. h. der Lauge, welche bei der Natronzellstoffabrikation erhalten wird, auf hohe Temperatur, z. B. 350°. Dabei wurden Alkoholausbeuten erhalten, die, als Methylalkohol berechnet, auf etwa 30 Proz. Abspaltung schließen lassen[2]). *Fischer* und *Schrader*[3]) fanden ebenfalls kürzlich, daß die Ligninkohle nach der Druckerhitzung des Salzsäurelignins nur ganz geringe Mengen Alkoxyl enthielt. Ähnliche Versuche hat kürzlich *Ritter*[4]) ausgeführt. Er konnte z. B. durch wiederholte Erhitzung von Holzspänen von „western yellow pine" mit 7proz. Natronlauge auf hohen Druck etwa 63 Proz. der berechneten Menge von Alkohol abspalten. Daß ausschließlich Methylalkohol vorlag, wurde nicht festgestellt. In dem Holzrückstand war merkwürdigerweise nach der Behandlung kein Alkoxyl mehr nachzuweisen. *Hawley* und *Aiyar*[5]) konnten bei der Aufstellung einer Bilanz zwischen dem „Methoxyl"-Inhalt einiger Holzarten und der Menge von „Methoxyl" in den Produkten der Trockendestillation davon nur 70 Proz. wiederfinden. Dabei wurde, was wohl als nicht genügend begründet angesehen werden muß, die Ausbeute von Methan als von dem Methoxyl des Holzes stammend mit einberechnet.

Wie bereits bemerkt wurde, wird immer angenommen, daß es sich hier ausschließlich um Methoxylgruppen handelt. Es ist aber niemals ein Versuch gemacht worden, diese Annahme zu stützen. Bei der Bestimmung nach *Zeisel-Stritar* können selbstverständlich andere Jodalkyle in Frage kommen als Jodmethyl. Zwar sind bekanntlich keine anderen Alkohole als Methylalkohol bei der Hydrolyse beobachtet worden. Aber, wie wir gesehen haben, werden verhältnismäßig geringe Mengen der theoretischen Alkoxylmengen abgespalten und in Substanz erhalten. Alles, was nicht abgespalten wird, entzieht sich der Beurteilung.

Die Frage, welche zunächst beantwortet werden sollte, war, ob die Alkoxylgruppen des Holzes, in diesem Falle *Fichtenholz*, ausschließlich aus Methoxylen bestehen oder ob eventuell auch andere Alkoxyle vorhanden sind. Ferner sollte festgestellt werden, ob die Ausbeute an Alkoxyl der nach *Zeisel-Stritar* berechneten entsprach.

---

[1]) Papierfabrikant 7, 27, 78, 104, 129, 1908.
[2]) *Hägglund*, Acta Acad. Aboensis 2, Nr. 3, 1922.
[3]) Abhandlung zur Kenntnis der Kohle 5, 332, 1922.
[4]) Journ. ind. and eng. chem. 15, 1264, 1923.
[5]) Ebendaselbst 14, 1056, 1922.

Für die Untersuchung wurde zunächst in Erwägung gezogen, die Destillation mit Jodwasserstoffsäure in so großem Umfange vorzunehmen, daß die Menge gebildeten Jodalkyls für eine quantitative Fraktionierung ausreichte. Bei näherer Überlegung hat sich diese Methode als wenig geeignet erwiesen. In viel einfacherer Weise kommt man hier zum Ziel durch Benutzung von einer ursprünglich von *Feist*[1]) angegebenen und später von *Willstätter* und *Utzinger*[2]) verbesserten Methode. Wenn nämlich bei der Benutzung der *Zeisel-Stritar*-Apparatur statt alkoholischer Silbernitratlösung Dimethylanilin oder besser eine 10proz. Trimethylaminlösung in absolutem Alkohol verwendet und die Destillation langsam betrieben wird, werden die Alkyljodide bis auf sehr geringe Mengen unter Bildung von Alkylphenyldimethylammoniumjodid bzw. Alkyltrimethylammoniumjodid aufgenommen und ausgeschieden.

Es zeigte sich bei der Untersuchung von sowohl Holz als von daraus hergestelltem Lignin, daß das Alkoxyl in der Tat *ausschließlich aus Methoxyl* bestand, da bei den Versuchen nur Phenyltrimethylammoniumjodid bzw. Tetramethylammoniumjodid gebildet wurde. — *Die Ausbeute stimmte mit der theoretischen überein.*

Damit ist endgültig festgelegt, daß *die Alkoxylgruppen im Fichtenholz ausschließlich Methoxylgruppen* sind.

Versuche.

I. Fichtenholz.

Als Ausgangsmaterial wurde feinpulverisiertes Material benutzt. Das Holz wurde zuerst mit Aceton und Äther von Harz und Fett befreit.

Alkoxylbestimmung nach *Zeisel-Stritar.*

	I	II
Holzmenge . . . . g	0,2291	0,2938
Ag J . . . . g	0,0769	0,0983
Auf CH_3O umgerechnet . . . . Proz.	4,43	4,42
	Mittel 4,43	

Alkoxylbestimmung nach *Feist-Willstätter.*

Vorlageflüssigkeit: 1 Teil Trimethylamin und 9 Teile absoluten Alkohols.

Holzmenge . . . . g	0,3196	0,3989
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase . . . . g	0,0915	0,1119
Bestimmung des Jodgehaltes im Jodid . Proz.	64,0	—
Berechnet für $(CH_3)_4NJ$ . . . . „	63,14	—
Ausbeute von CH_3O in Proz. des Holzgewichtes	4,4	4,34

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2094, 1900.
[2]) Liebigs Ann. **382**, 148, 1911.

II. Lignin.

A. Alkalilignin.

Holzspäne von Fichte wurden in bekannter Weise mit Natronlauge während 6 Stunden bei 175° aufgeschlossen. Das Verhältnis Holz : NaOH war wie 5 : 1. Die Lauge („Schwarzlauge") wurde vollständig ausgewaschen. Aus der fünffach mit Wasser verdünnten Schwarzlauge wurde das Alkalilignin mit einem geringen Überschuß von Salzsäure bei etwa 50° ausgefällt. Das Lignin wurde mit heißem Wasser gründlich ausgewaschen. Die Ausbeute betrug 23,5 Proz. des Holzgewichtes oder, auf harz-, fett- und aschefreies Holz bezogen, 23,9 Proz. Der Aschengehalt des Lignins war 0,1 Proz. Die Zellstoffausbeute betrug 43,6 Proz.

Alkoxylbestimmung nach *Zeisel-Stritar.*

	I	II
Lignin . . . . g	0,3555	0,2370
Ag J . . . . g	0,3633	0,2484
Auf CH_3O umgerechnet . . . . Proz.	13,5	13,8
	Mittel 13,7	

Alkoxylbestimmung nach *Feist-Willstätter.*

Vorlageflüssigkeit: 1 Teil Trimethylamin und 9 Teile absoluten Alkohols.

Lignin.	g	0,4163
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase. .		0,3665
Bestimmung des Jodgehaltes im Jodid . . .	Proz.	63,6
Berechnet für $(CH_3)_4NJ$	„	63,14
Ausbeute von CH_3O des Ligningewichtes . .	„	13,6

Vorlageflüssigkeit: Dimethylanilin (rein, unverdünnt).

Lignin.	g	0,6956
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase .	g	0,7429
Schmelzpunkt		211°
Schmelzpunkt von $C_6H_5N(CH_3)_2J$		211°
Ausbeute von CH_3O des Ligningewichtes . .	Proz.	12,6

Es ist offenbar, daß das Dimethylanilin, wie auch *Willstätter* und *Utzinger* beobachtet haben, mit dem Alkyljodid langsam reagiert, weshalb Verluste von Alkyljodid entstehen. Dadurch wird die nicht quantitative Ausbeute erklärt.

Das oben erwähnte Lignin enthielt Harz und Fett. Diese Verunreinigungen wurden durch Extraktion mit Äther entfernt. Ätherextrakt 8,6 Proz. des Ligningewichtes. Die Ausbeute von *Reinlignin* bezogen auf asche-, harz- und fettfreies Holz betrug also **21,9 Proz.** Das extrahierte Lignin wurde mit siedendem absoluten Alkohol extrahiert. In Lösung gingen dabei 52,7 Proz. Das alkohollösliche und alkoholunlösliche Lignin wurden getrennt untersucht.

1. Alkohollösliches Alkalilignin.

Alkoxylbestimmung nach *Zeisel-Stritar.*

	I	II
Lignin . . . . g	0,3168	0,2710
Ag J . . . . g	0,3585	0,3066
Auf CH_3O umgerechnet . . . . Proz.	14,9	14,6
	Mittel 14,8	

Alkoxylbestimmung nach *Feist-Willstätter.*

Vorlageflüssigkeit: 1 Teil Trimethylamin und 9 Teile absoluten Alkohols.

Lignin	g	0,5770
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase	g	0,5322
Bestimmung des Jodgehaltes im Jodid	Proz.	63,25
Berechnet für $(CH_3)_4NJ$	,,	63,14
Ausbeute von CH_3O des Ligningewichtes	,,	14,5

2. Alkoholunlösliches Alkalilignin.

Alkoxylbestimmung nach *Zeisel-Stritar.*

Lignin	g	0,2711
AgJ	g	0,2992
Auf CH_3O umgerechnet	Proz.	14,6

Alkoxylbestimmung nach *Feist-Willstätter.*

Lignin	g	0,4302
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase	g	0,3945
Bestimmung des Jodgehaltes im Jodid	Proz.	62,9
Berechnet für $(CH_3)_4NJ$	,,	63,14
Ausbeute von CH_3O des Ligningewichtes	,,	14,2

B. Salzsäurelignin.

Als Ausgangsmaterial wurde ein Ligninpräparat benutzt, welches durch Behandlung von Fichtenholzspänen mit hochkonzentrierter Salzsäure während kurzer Zeit bereitet wurde.

Alkoxylbestimmung nach *Zeisel-Stritar.*

	I	II
Lignin . . . g	0,2087	0,2141
AgJ . . . g	0,1998	0,2020
Auf CH_3O umgerechnet . . . Proz.	12,58	12,42
	Mittel	12,5

Alkoxylbestimmung nach *Feist-Willstätter.*

Vorlageflüssigkeit: 1 Teil Trimethylamin und 9 Teile absoluten Alkohols.

Lignin . . . g	0,4702	0,8424
Ausgeschiedene Menge Jodid der Ammoniumbase . . . g	0,3815	0,6592
Bestimmung des Jodgehaltes im Jodid . Proz.	62,86	62,90
Berechnet für $(CH_3)_4HJ$ . . . „	63,14	63,14
Ausbeute von CH_3O in Proz. d. Ligningehaltes	12,52	12,33

Die quantitative Bestimmung der freien Blutfettsäuren[1]).

Von

A. v. Szent-Györgyi und Tyuzi Tominaga.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die ausgebreiteten Studien, die in den letzten Jahren durch *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi* (1) über die Genese der perniziösen Anämie ausgeführt wurden, nahmen ihren Ausgangspunkt von der chemischen Analyse der hämolytischen Bestandteile des normalen Blutes. Diese Analyse zeigte, daß die normalen hämolytischen Bestandteile des Blutes nichts anderes als freie höhere Fettsäuren sind, d. h. Fettsäuren, die als freie Säuren oder als Seifen, nicht aber in esterartiger Bindung vorhanden sind. Die weitere Erforschung der Anämie hatte nun eine Methode zur Voraussetzung, die es gestattete, diese Fettsäuren aus Blutmengen, die bei Anämiekranken zugänglich sind, rein darzustellen und quantitativ zu bestimmen. Eine solche Methode war Grundbedingung des weiteren Fortschrittes, hatte aber auch sein eigenes Interesse.

Die Angaben in der Literatur über die freien Blutfettsäuren sind sehr spärlich und enthalten keine oder nur ungenügende Angaben über die angewandte Methodik.

Die Anwesenheit von freien Fettsäuren im Blute wurde von *Hoppe-Seyler* im Jahre 1852 gefunden und 1884 beschrieben (2). Hier handelt es sich aber bloß um qualitativen Nachweis. Eine quantitative Analyse bei verschiedenen Tieren wurde von *Abderhalden* in den bekannten blutanalytischen Tabellen (3) gegeben. Wir finden hier aber keine Angaben über die angewandte Methodik. Öfters behandelt finden wir die freien Blutfettsäuren in der französischen Literatur bei *Abelous* und *Soula, Achard, Achard* und *Feuillié* und *Lemeland*, die Angaben über die angewandten Methoden sind aber unvollständig, entbehren den Bericht über die so nötigen Kontrollen und sind auch nicht für die für uns nötigen Mikrodimensionen ausgearbeitet.

Nachdem uns die Erfahrung bald lehrte, daß die Aufgabe einer quantitativen Analyse mit ganz besonderen Schwierigkeiten verbunden ist, die in den oben genannten Arbeiten keine Berücksichtigung finden,

---

[1]) Unter Fettsäuren verstehen wir in vorliegender Publikation stets nur höhere Fettsäuren.

haben wir die Frage einer eingehenden systematischen Untersuchung unterzogen, um auf den gewonnenen Erfahrungen eine genügend genaue Mikromethode aufzubauen.

Die Schwierigkeiten einer genauen Mikrobestimmung der freien Blutfettsäuren sind sehr groß und vielseitig. Erstens ist die relative Menge dieser Substanzen sehr gering. Sie bildet kaum ½ Proz. der Blutlipoide, die selber weniger als ½ Proz. des gesamten Blutes ausmachen. Diese Kleinheit der Menge der zu bestimmenden Substanz ist nicht nur selbst eine Schwierigkeit, sondern läßt auch alle anderen Schwierigkeiten in erhöhtem Maße zur Geltung kommen.

Schon die Extraktion dieser geringen Menge freier Blutfettsäuren ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, da diese sich im Blute eigentlich nicht frei, sondern an andere, nicht lipoide Bestandteile des Blutes gebunden befinden. Die weitaus größte Schwierigkeit der Methode liegt aber in der scharfen Isolierung der extrahierten Fettsäuren, nachdem einerseits die Begleitsubstanzen, andererseits auch das zu isolierende Material, die Fettsäuren, außerordentlich lästige Eigenschaften haben, die das Arbeiten in hohem Maße erschweren.

Wir wollen diese Schwierigkeiten, wenn auch nur kurz gefaßt, weiter unten besprechen und hier nur vorausgreifend so viel erwähnen, daß es gelungen ist, die Schwierigkeiten der Aufgabe zum größten Teil zu erkennen und zu beseitigen, und eine Methode aufzubauen, die es gestattet, die freien Fettsäuren von 10 ccm Blut mit einem additiven Fehler von 0,0002 g zu bestimmen.

Bei der Besprechung der Methode wollen wir, den praktischen Bedürfnissen folgend, mit einer allgemeinen Besprechung der einzelnen Phasen des Vorganges beginnen und danach kurz die praktische Ausführung schildern.

Allgemeines über die Isolierung und Bestimmung der freien Blutfettsäuren.

Vorbereitung zur Extraktion.

Entsprechend der einstimmigen Erfahrung der Lipoidchemiker, konnten wir uns auch überzeugen, daß eine quantitative Extraktion der lipoiden Blutbestandteile nur mit starkem heißen Alkohol möglich ist. Eine quantitative Extraktion in relativ kurzer Zeit ist mit keinem anderen Lösungsmittel möglich[1]. Die große Schwierigkeit der Alkoholextraktion ist

[1] Die Methoden, bei denen eine quantitative Extraktion durch einen vorhergehenden chemischen Abbau des Materials ermöglicht wird (durch Laugen, Säuren oder Fermente), waren für unsere Zwecke natürlich unbrauchbar, da sie zur Spaltung von Fetten oder Phosphatiden und somit zu künstlicher Neubildung von Fettsäuren Anlaß geben konnten. Durch den Dampf des kochenden Alkohols kann das Material ebenfalls derart verändert werden, daß eine nachfolgende Extraktion mit anderen Lösungsmitteln ebenfalls quantitative Resultate ergibt. Wir haben aber diese anfangs angewendete Methode wegen ihrer Umständlichkeit bald verlassen.

aber die, daß dieses Lösungsmittel stets größere Mengen von Hämatin in Lösung bringt, das durch seine besonders lästigen Eigenschaften ein weiteres Arbeiten mit dem Extrakte sehr schwierig, wenn nicht unmöglich gestaltet. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum in den bisher empfohlenen und allgemein angewendeten Methoden kein Alkohol als Extraktionsmittel angewendet wird. Bekanntlich extrahiert *Bang* (4) mit kaltem Alkohol, *Bloor* (5) mit Äther-Alkohol. Unsere, über diese Methoden angestellten Versuche zeigten aber, daß, wie zu erwarten war, hier die Extraktion keine quantitative ist. Es bleibt stets der nicht unbeträchtliche Teil von 10 bis 20 Proz. der Lipoide im Material unextrahiert zurück. Da der von uns gesuchte Bestandteil, die Fettsäuren, wahrscheinlich eben zu der schwer extrahierbaren Fraktion gehören, waren diese Methoden für unsere Zwecke unbrauchbar.

Um dieser Schwierigkeit Herr zu werden, suchten wir nach einer Methode, mit der das Hämoglobin von vornherein so verändert werden konnte, daß es bei der nachfolgenden Extraktion kein Hämatin in größeren Mengen abgibt, und mit der auch das etwa abgegebene Hämatin entfernt werden konnte. Hierbei zeigte sich nun, daß das Barium zur Erreichung dieses Zieles ein souveränes Mittel ist. Das mit Ba vorbehandelte Blut gibt nun ein nur schwach gefärbtes Filtrat, aus dem bei Zugabe von Äther sich das noch gelöste Hämatin quantitativ abscheidet.

War also die Alkoholextraktion ermöglicht, so eröffnete sich die Frage der Vorbereitung der Substanz, die doch ohne vorhergehende Entwässerung nicht extrahiert werden konnte.

Zuerst versuchten wir die *Bang*sche Methode, indem wir das Blut in Filterpapier aufgesogen trockneten. Nachdem aber bei dieser Methode bei der langen Dauer der Trocknung der relativ großen Menge Blut eine fermentative, bakterielle oder oxydative Zersetzung der Lipoide zu befürchten war und diese Methode auch noch mit anderen, praktisch unüberwindbaren Schwierigkeiten verbunden war[1]), suchten wir nach einem geeigneten Entwässerungsmittel, in das das frische defibrinierte Blut direkt eingegossen werden konnte.

Nachdem sich zu diesem Zwecke Aceton als geeignetes Mittel erwies, gestaltete sich nun die Methode derart, daß das Blut direkt in das Aceton eingegossen wurde, dem zur Vorbehandlung des Hämoglobins einige Tropfen einer $BaCl_2$-Lösung zugesetzt waren[2]). Nachdem das Aceton mit Blut am Wasserbade aufgekocht wurde, wird filtriert und der Filterrückstand zur weiteren Extraktion in eine selbstbereitete Hülse eingeschlossen.

---

[1]) In einem dickeren Filtrierpapier, wie es hier nötig war, befinden sich stets große Mengen von Fettsäuren in relativ fester Bindung, so daß das Papier nur sehr schwer fettsäurefrei zu bekommen ist. Gegenüber den Gesamtlipoiden ist die Menge dieser Fettsäure nicht groß, so daß sie eine Gesamtlipoidbestimmung bei vorheriger oberflächlicher Extraktion des Papiers kaum stören würde. Bei der Bestimmung der geringen freien Blutfettsäure kann der Fehler aber sehr groß werden.

[2]) Alkohol konnte zur entwässernden Vorbehandlung nicht angewandt werden, da bei dem großen Wassergehalt des Blutes der Alkohol nicht genügend stark präzipitierend wirkt, das ganze Material verschmiert und trotz der Gegenwart des $BaCl_2$ das Hämoglobin in Lösung bringt.

Die Extraktion.

1. Extraktionsmittel. Nach dem oben Gesagten kommt als Extraktionsmittel wohl nur Alkohol in Betracht, und die einzige Frage kann nur den Stärkegrad des Alkohols betreffen. Nachdem die Erfahrung lehrte, daß die Menge des gelösten Hämatins mit dem Wassergehalt des Alkohols zunimmt, haben wir zur Extraktion den sogenannten absoluten Alkohol angewendet.

2. Die Extraktionsmethode. Der Extraktionsapparat. Die Anforderung, die wir gegenüber der Extraktionsmethode stellen müssen, ist die, daß die Extraktion einerseits unter optimalen, andererseits unter gut reproduzierbaren Bedingungen vor sich gehen muß.

Die in Europa allgemein angewendete Extraktion nach *Soxhlet* mit dem *Soxhlet*schen Apparate hat den großen Vorteil, daß durch das Hebersystem das Lösungsmittel stets vollständig abgehebert und das Material in dieser Weise stets in vollständig frischem Lösungsmittel gebadet wird. Der große Vorteil dieses periodischen Arbeitens wird aber durch den sehr großen Nachteil verdeckt, daß das Lösungsmittel kalt, ohne kontrollierbare und reproduzierbare Temperatur auf das Material fließt, ein Nachteil, der für uns den Apparat unbrauchbar machte.

Die Extraktion bei der Temperatur des Siedepunktes der Extraktionsflüssigkeit wurde durch *Berntrop* (6) eingeführt. Diese Temperatur ist natürlich die denkbar günstigste und streng reproduzierbar. Die ursprüngliche *Berntrop*sche Methode mißt aber die Hebervorrichtung.

Beide genannten Prinzipien, Heber und Kochpunkt, wurden durch *Kumagawa* und *Suto* (7) vereinigt. Der von diesen Forschern angegebene Apparat war aber für unsere Zwecke nicht geeignet, da er für unsere Mikrodimensionen mit den angewendeten geringen Flüssigkeitsmengen allzu schwerfällig schien. Wir haben also unter der freundlichen Mitwirkung der Firma A. Dargatz zu Hamburg selbst einen Apparat konstruiert, der die genannten Prinzipien zur Grundlage hat, das saubere Manipulieren mit kleinen Flüssigkeits- und Substanzmengen in einfacher Weise gestattet und auch in anderen Beziehungen allen unseren Anforderungen entsprach[1]).

10 cm

E

CO_2

Abb. 1.

Struktur und Arbeitsweise des Apparates ist aus Abb. 1 ohne weiteres verständlich. Der Apparat besteht nur aus Glas. Die Schleifstücke sind vor dem Einfließen des am Kühler kondensierenden Wassers geschützt. Das Seitenröhrchen, das gewöhnlich einfach abgeschlossen wird, gestattet das Auffüllen des Apparates mit einem indifferenten Gase (CO_2 oder H_2) für den Fall, daß man mit sehr leicht oxydablen Substanzen arbeitet. Der Apparat kann auch zugleich zur Redestillation der nötigen Extraktionsflüssigkeiten dienen, für welchen Zweck ein heberloses Einsatzgefäß dient[2]).

---

[1]) Selbstverständlich erheben wir mit diesem Apparat keinen Anspruch auf Originalität, da unser Apparat nichts prinzipiell Neues darstellt und, wie wir nachträglich erfuhren, eine der unseren auch in der äußeren Form ähnliche Konstruktion bereits im Jahre 1908 von *W. Kulka* (8) empfohlen wurde. — [2]) Zum Apparat gehören zwei Kolben und drei Einsatzgefäße verschiedener Größe.

Eine nicht unwesentliche Frage ist die nach der Heizung des Apparates. Das Wasserbad hat sehr große Nachteile. Zunächst ist seine Temperatur zu niedrig, um bei der Kochträgheit des Alkohols ein genügend intensives Kochen zu erreichen. Zu diesem Zwecke muß das Kochkölbchen ganz im Wasserbade versenkt werden. Unter diesen Bedingungen ist aber ein Einsickern von kondensiertem Wasser in den Apparat kaum zu vermeiden. Dieses kann so stark sein, daß durch die Wasserverdünnung des Alkohols große Mengen Blutfarbstoff in Lösung gehen. Ist die Verdünnung so weit gegangen, daß der Alkohol sich nicht mehr mit Äther mengt, so kann der Farbstoff auch nicht mehr entfernt werden, und die ganze Analyse ist zu verwerfen. Dieses Arbeiten im Wasserbade hat den weiteren großen Nachteil, daß hier das Siedekölbchen auch in seinem mit Alkohol nicht gefüllten Teile erwärmt wird. Hierdurch wird bedingt, daß der aufspritzende Alkohol verdampft und die gelösten Substanzen in Form einer weiter schwer zu behandelnden Kruste zurückläßt. Bei oxydablen Substanzen bedeutet dieses Austrocknen auch eine große Oxydationsgefahr.

Aus diesem Grunde ist also die elektrische Heizung vorzuziehen, da sie allein geeignet ist, sicher gute Resultate zu geben, und zwar geschehe die Heizung stets von unten, so daß nur der mit Alkohol gefüllte Teil des Kölbchens erwärmt wird. Sehr günstig ist, wenn das Kölbchen nicht direkt mit dem glühenden Heizkörper in Berührung steht und die Übertragung der Wärme durch die zwischen Kölbchen und Heizkörper befindliche Luft geschieht. Hierdurch wird ein durchaus schönes, gleichmäßiges Kochen bedingt.

Die Isolierung der Fettsäuren.

Befindet sich nun das gesamte Blutlipoid im Extrakte, so folgt die Aufgabe der Isolierung der Fettsäuren. Die Isolierung der Fettsäuren wird durch ihre Eigenschaft ermöglicht, daß sie sich als freie Säuren in allen organischen Lösungsmitteln glatt lösen, aber in Form ihrer Natriumsalze in Petroläther *ganz unlöslich* sind, und zwar gilt dies ebenso für die gesättigten wie für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Bietet diese Eigenschaft der Fettsäuren auch eine feste Grundlage für ihre Trennung von den übrigen Lipoiden, so bleibt doch ihre quantitative Isolierung eine sehr schwierige Aufgabe. Die Schwierigkeiten erwachsen von beiden Seiten, sowohl von seiten der zu isolierenden Substanz, wie auch von seiten der Begleitstoffe.

Erstens hat die Fettsäure die starke Neigung mit verschiedenen Lipoiden (hauptsächlich Phosphatiden) und eiweißartigen Stoffen (auch mit dem Blutfarbstoff) schwer zu trennende Komplexe zu bilden. Andererseits haben die Fettsäuren auch die bekannte, so lästige Eigenschaft, daß sie bei alkalischer Reaktion, also als Seifen sehr bald zu kolloidalen Massen anschwellen, die jede weitere Manipulation in hohem Maße erschweren oder gar unmöglich gestalten.

Die störenden Begleitstoffe sind teils bekannter, teils unbekannter Konstitution.

Phosphatide und *Hämatin* sind zum Teil bereits oben besprochen. Von letzterem sei hier noch so viel erwähnt, daß es die Eigenschaften der Fettsäuren weitgehend nachahmt. Es ist in allen Lipoidlösungsmitteln, auch in Petroläther löslich, geht aber bei alkalischer Reaktion in dieser Flüssigkeit nur sehr unvollständig in Lösung. Da eben das analoge Verhalten der Fettsäuren als Grundlage ihrer Isolierung dient, bedeutet dies eine sehr große Schwierigkeit. Eine weitere große Schwierigkeit bildet eine weiße, näher nicht analysierte phosphorhaltige Substanz, die die Fettsäure durch alle Reinigungsprozesse mit großer Hartnäckigkeit begleitet.

Ein weiteres, sehr großes Hindernis bildete eine näher noch nicht definierte, überaus interessante hydrotrope Substanz, die auch aus biologischem Standpunkte eine eingehendere Erforschung verdiente. Unter ;,Hydrotropie" verstehen wir nach *C. Neuberg* (9) jene Eigenschaft mancher Stoffe, daß sie lipoide und wässerige, also an und für sich unmengbare Flüssigkeiten zu einer scheinbar einheitlichen Phase zu vereinigen vermögen. Bei unserer genannten Substanz tritt diese Eigenschaft in folgender Weise in Erscheinung:

Bekanntlich ist bereits 96proz. Alkohol mit Petroläther unmengbar. Verdünnen wir unseren alkoholischen Extrakt von 10 ccm Blut in 20 ccm Alkohol mit Wasser auf 40 ccm (also auf einen Alkoholgehalt von 50 Proz.) und machen die Flüssigkeit mit verdünntem $NaOH$ alkalisch, und versuchen nun mit Petroläther (10 ccm) auszuschütteln, um Neutralfett und Cholesterin zu entfernen, so sehen wir sehr oft, daß sich die beiden Phasen nicht nur sehr unvollkommen scheiden, sondern daß der Petroläther oft ganz verschwindet und mit dem Rest der Flüssigkeit eine wasserhelle einheitliche Phase bildet. Weiter zugesetzter Petroläther verschwindet in derselben Weise, und nur ein sehr großer Überschuß von Wasser bringt endlich eine sehr unvollständige Scheidung der beiden Phasen zustande. Wenn man bedenkt, daß die absolute Menge der hydrotropen Substanz nur sehr gering sein kann, so muß man sich wirklich über ihre große Aktivität wundern, die nicht einer physiologischen Bedeutung entbehren kann. Bei saurer Reaktion ist die Substanz hydrotropisch unwirksam. Natürlich ist aber bei dieser Reaktion eine Trennung der Fettsäuren von den anderen Lipoiden unmöglich. Ein großer Teil dieser störenden Substanzen konnte durch eine Fraktionierung durch Aceton erreicht werden, in welchem Mittel nach der beschriebenen Vorbehandlung die größte Menge der Phosphatide unlöslich ist.

Den größten Fortschritt bei unserer Arbeit bedeutete aber die Erkenntnis, daß all die genannten Störungen viel geringer werden oder gar verschwinden, wenn man alle Manipulationen in Abwesenheit von Wasser, also in lipoiden Lösungsmitteln ausführt. Diese Erfahrung führte uns dann zur Erkennung der für uns so überraschenden Tatsache, daß die nötigen chemischen Reaktionen, die den Charakter der Ionenreaktionen tragen (wie die Überführung der Fettsäuren in Seifen und das Freimachen der Fettsäure), in exquisit lipoiden Lösungsmitteln, wie Petroläther, in vollständiger Abwesenheit von Wasser glatt ausgeführt werden können. Erst die Erkennung dieser Tatsache machte uns den Ausbau einer wirklich zuverläßlichen Mikromethode möglich.

Es wurde also das Wasser des Blutes, soweit möglich, schon bei der Vorbehandlung entfernt und die ganzen weiteren Manipulationen ohne Wasser in lipoiden Lösungsmitteln vorgenommen.

Technisches.

Im Laufe der Präparierungen müssen Lösungen wiederholt von Gefäß zu Gefäß übertragen, Flüssigkeiten verdampft, Präzipitate abgesondert werden. Zu diesem Ende werden verschiedene Manipulationen angewendet.

Die Abscheidung von Präzipitaten geschieht stets in der Zentrifuge. Alle in Betracht kommenden Niederschläge setzen sich außerordentlich rasch zu Boden, so daß stets ein sehr kurzes Drehen an einer mit mittlerer Geschwindigkeit laufenden Zentrifuge ausreicht.

Das Verdampfen geschieht stets bei vermindertem Druck der Wasserstrahlpumpe. Diese Manipulation machte die Konstruktion eines besonderen Kölbchens nötig. Der Verschluß der Destillierkölbchen mit Gummistopfen ist bei den Mikromanipulationen nicht statthaft. Der mit den Dämpfen der Lösungsmittel in Berührung stehende Gummi hat eine starke Neigung zum Bröckeln und bietet auch keinen genügend dichten Verschluß. Gewöhnliche Glasschliffe waren auch nicht brauchbar, da diese doch nicht befettet werden durften und der unbefettete Schliff keinen genügenden Verschluß bietet. Aus diesem Grunde wurde das Kölbchen mit einem Käppchen ausgestattet und der Schliff außen auf dem Kolbenhalse angebracht. Dieser Schliff kann nun ruhig befettet werden. Die Konstruktion ist aus der Abb. 2 verständlich[1]).



Abb. 2.

Bei sehr leicht siedenden Flüssigkeiten wird die Öffnung des oberen Röhrchens einfach mit dem Finger zugehalten. Hierbei vermeidet man die Gefahr des Überkochens, da doch das Vakuum jeden Augenblick aufgehoben werden kann. Ist ein dichterer Verschluß erwünscht, wie zur Entfernung der letzten Reste von Flüssigkeiten, so schließt man das Röhrchen mit einem Vakuum-Gummischlauch, dessen obere Öffnung man mit einem Glasstäbchen oder Röhrchen mit Hahn verschließt. Auf das Seitenrohr wird der Schlauch der Vakuumpumpe montiert.

Beim Absaugen von niedrig siedenden Flüssigkeiten soll man vorsichtig zunächst mit einem schwächeren Vakuum beginnen, indem man die Wasserstrahlpumpe nur mit wenig Wasser speist. Ist die Flüssigkeit nun abgekühlt, so kann das Vakuum gesteigert und das Verdampfen noch durch Erwärmen im Dampfe des Wasserbades befördert werden. Während der Destillation hält man das Kölbchen stets in energischer zirkular schwankender Bewegung in der Hand.

Das Übertragen der Flüssigkeiten von Gefäß zu Gefäß geschieht nach *Pregl* (10) stets mit Saugen, nie durch Gießen. Der Vorgang wird durch

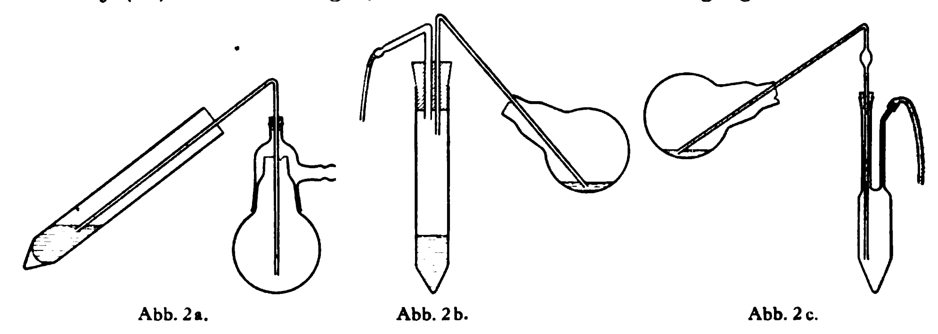


Abb. 2a. Abb. 2b. Abb. 2c.

Abb. 2a, b, c erläutert. Die Saugeröhrchen haben ein Lumen von 0,5 bis 1,0 mm. Zum Saugen gebrauchen wir stets Fahrrad-Ventilgummischlauch.

[1]) Am besten hat man einen Satz von Kölbchen von 150, 80, 40, 20 ccm bereit.

Dieser so leichte, biegsame, dünne Gummischlauch leistet uns bei allen Mikromanipulationen ausgezeichnete Dienste. Seine Einführung in das Laboratorium ist wärmstens zu empfehlen. Besonders unentbehrlich ist dieser Schlauch für uns beim Pipettieren geworden. Wir montieren unsere Pipetten gewöhnlich mit diesem Schlauch, der durch seinen so geringen Rauminhalt ein außerordentlich genaues Arbeiten gestattet[1]).

Da wir die zu wägende reine Fettsäure zu Ende der Manipulationen in Lösung in Händen hatten und der Verdampfungsrückstand an der Wage bestimmt werden mußte, hatten wir endlich ein besonderes Gefäß nötig, das zugleich das Verdampfen und das Wägen des Rückstandes gestattete. Das Gefäß ist in Abb. 3 abgebildet. Da es auch zur Wägung dient, ist bei ihrer Konstruktion das a. a. O. beschriebene Prinzip der Kombination von Schliff und Kapillare angewendet (11). Bei der Wägung gestatten die Röhrchen dieselbe Genauigkeit wie die hier (11) beschriebenen Filterröhrchen.

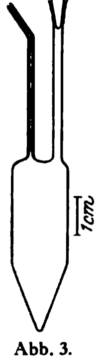


Abb. 3.

Das Abdestillieren der Flüssigkeit geschieht ebenfalls bei vermindertem Druck. Zu diesem Ende wird der Vakuumschlauch an das Kapillarrohr angesetzt. Hält man das Gefäß schräg, so erhält die Flüssigkeit eine große Oberfläche. Man beginnt mit einem schwachen Vakuum und bewegt das Röhrchen in schräger Stellung schwach hin und her, um einem Überkochen vorzubeugen. Das endgültige Trocknen geschieht in dem a. a. O. beschriebenen Trockenschrank (11). Verfügt man nicht über einen solchen, so kann man das Röhrchen praktisch genügend trocknen, indem man den Vakuumschlauch auf das dickere Rohr montiert (nachdem man den Stopfen entfernt hat) und auf die Kapillare einen Ventilschlauch setzt. Man gibt der Vakuumpumpe vollen Strahl, versenkt das ganze Gefäß in den Dampf des Wasserbades, hält den Ventilschlauch zu, wobei im Gefäßchen ein relativ hohes Vakuum entsteht. Nun läßt man den Ventilschlauch los und läßt einige Sekunden Luft durchstreichen, kneift dann wieder zu und wiederholt das Spiel noch ein- bis zweimal. Dann zieht man das Röhrchen aus dem Dampf heraus, nimmt die Schläuche ab, setzt den Glasstopfen ein und läßt erkalten.

Hat man zu Beginn etwas zu viel Flüssigkeit im Röhrchen, so kann man die Manipulation damit beginnen, daß man den Glasstopfen entfernt, das Röhrchen in vertikaler Stellung befestigt und dann durch die Kapillare (mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe) einige Minuten lang einen langsamen, gleichmäßigen Luftstrom durchsaugt, wobei die Flüssigkeit weitgehend eintrocknet.

Das Gefäßchen konnte mit sehr großem Vorteil auch bei den verschiedensten anderen Mikromanipulationen verwendet werden. So diente es z. B. oft zur Acetylierung, Bromierung, titrimetrischen Mikromolekulargewichtsbestimmung usw.

Ist das Material nun in der beschriebenen Weise ganz vom Lösungsmittel befreit und gewogen, so kann man, wenn erwünscht, eine approximative

---

[1]) In den letzten Jahren hat sich der eine von uns bei Durchströmungen von nach *Langendorff* isolierten Kaninchenherzen stets dieses Schlauches bedient. Der Durchlauf der Coronarien ist doch viel geringer als die Flüssigkeitsmenge, die durch den Schlauch durchgelassen wird, so daß die Weite des Schlauches auch für relativ große Herzen gut ausreicht. Die Biegsamkeit, das geringe Volumen bietet auch hier sehr nennenswerte Vorteile.

Bestimmung des Schmelzpunktes vornehmen. Das Röhrchen wird in das langsam erwärmte Wasserbad getaucht. Ein fortwährendes Rühren sorgt für gleichmäßige Temperatur. Das in ganz dünner Schicht an die dünne Glaswand des Röhrchens angetrocknete Material folgt wahrscheinlich sehr eng der Temperatur des Wasserbades. Das plötzliche Durchsichtigwerden des Materials läßt den Schmelzpunkt, soweit dieser einheitlich ist, bei aufmerksamer Beobachtung gut erkennen. Eine Lupe leistet hierbei gute Dienste.

Die Wägung des Materials geschah stets an der *Kuhlemann*schen Wage. Da aber der Fehler der Methode 0,2 mg beträgt, kann eine jede gute analytische Wage mit einer Genauigkeit von 0,1 mg angewendet werden.

Wir hoffen auch, daß wir bald die Methode angeben können, mit der die Fettsäure an Stelle der Wägung auch titrimetrisch gemessen werden kann.

Nachdem das Lösungsmittel vor der Übertragung in das Wägeröhrchen eine nur ganz geringe Menge von unlöslicher Verunreinigung enthält, wurde (um ein Zentrifugieren mit der nötigen Verdünnung der Flüssigkeit zu ersparen) ein Saugröhrchen konstruiert, das zum Übertragen und zugleich auch zum Filtrieren dient. Das Röhrchen ist in der Abb. 4 abgebildet. Der erweiterte Teil ist mit Asbest ausgefüllt. Das Röhrchen wird derart hergestellt, daß ein etwa 3 bis 4 mm dickes Glasrohr zur Kapillare ausgezogen wird. Das Ende des dickeren Rohrteiles wird nun mit etwas Asbest ausgestopft. Dann wird das Rohr auch jenseits der Asbestfüllung ausgezogen. Sonst sind Form und Dimensionen dieses Röhrchens dieselben, wie die der anderen Saugeröhrchen. Nach Gebrauch kann das Röhrchen durch Durchsaugen von rauchender Salpetersäure, Wasser und Aceton rasch gereinigt werden.

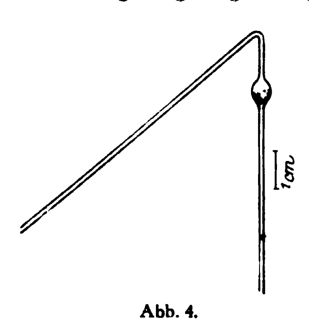


Abb. 4.

Die Methode.

(Kurze Beschreibung der praktischen Ausführung der Methode.)

Der Gang der Präparierung ist der folgende: 1. Entwässerung mit Aceton — zugleich Behandlung mit Barium. 2., 3., 4. Extraktion mit Alkohol. 5., 6., 7. Entfernung des Hämatins, Ausschütteln der Extrakte mit Petroläther. 8. Fraktionierung mit Aceton, d. h. Ausschaltung des acetonunlöslichen Teiles (hauptsächlich Phosphatide). 9. Überführung der Fettsäuren in ihre Natriumseifen. 10. Entfernung des größten Teiles der petrolätherlöslichen Fraktion (hauptsächlich Cholesterin, Neutralfett, Cholesterinester). 10., 11., 12. Freimachen der Fettsäuren aus ihren Seifen. 13. Ausfällen der Fettsäuren aus Petroläther in Form ihrer Natronsalze. Waschen des Präzipitates. Befreiung der Fettsäuren aus ihren Seifen. 14. Nochmaliges Fraktionieren mit Aceton, Trocknen, Wägen.

Im einzelnen sind die Manipulationen die folgenden:

1. Man gießt in ein etwa 100 ccm fassendes Bechergläschen 30 ccm Aceton, setzt dann aus einer Tropfflasche 4 ccm $BaCl_2$-Essigsäuremischung zu (s. unten). Dann läßt man unter stetem Rühren aus einer Pipette 10 ccm defibriniertes Blut einlaufen.

2. Das Aceton wird am Wasserbade unter stetem starken Rühren mit einem Glasstäbchen bis zum Sieden erwärmt. Die heiße Flüssigkeit wird in einen Meßzylinder von 50 ccm (mit Glasstopfen) filtriert. Zum Filtrieren

gebraucht man ein gewöhnliches 8 bis 10 ccm Rundfilter, das man vorher durch zweistündiges Extrahieren mit heißem Alkohol entfettet hat. Zur Filtrierung nimmt man einen entsprechend kleinen Trichter. Ist die Flüssigkeit gut abgelaufen, so biegt man die Ränder des Filters noch über den Filterrückstand, der in dieser Weise ganz bedeckt wird. Nun preßt man das Material mit der platten Fläche eines Glasstopfens tüchtig aus.

3. Nun bereitet man sich eine geeignete Extraktionshülse. Dies geschieht derart, daß man ein (mit Alkohol vorher extrahiertes) etwa 10 ccm langes und ebenso breites Filterpapier um eine Eprouvette wickelt. Nun wird die Eprouvette etwas zurückgezogen und das freie, etwa 2 cm lange Ende des Filterpapierröhrchens umgestülpt und hierdurch das eine Ende der Hülse abgeschlossen. Nun bringt man den Filterrückstand mit einem Spatelchen in die Hülse und verschließt die obere Öffnung der letzteren mit dem Filter, das man in Form eines losen Knäuels noch in die Hülse einsetzt.

3. Die Hülse mit dem Material wird in das mittlere Einsatzgefäß des Extraktionsapparates (*E* der Abb. 1) gesetzt. Die Hülse darf das Einsatzgefäß nicht ganz ausfüllen. Es muß zwischen Hülse und Gefäß wenigstens an der einen Seite ein breiterer Spalt bleiben. Ist die Hülse zu groß, so kann man dies noch korrigieren, indem man sie flach zusammendrückt.

4. In den großen Kolben des Extraktionsapparates werden etwa 25 ccm absoluten Alkohols gegossen. Zur Kochkatalyse setzt man in den Kolben eine geringe Menge von fein granuliertem Zink. Das Material mit Einsatzgefäß wird in den Apparat eingeführt und bei elektrischer Erwärmung 2 Stunden lang extrahiert.

5. Das Material wird aus dem Apparat entfernt, das heberlose Einsatzgefäß eingesetzt und der Extrakt bis auf einen Rest von etwa 5 ccm abdestilliert. Nun tropft man in den Kolben fünf Tropfen Bariummischung.

6. Man bringt den Kolbeninhalt in ein etwa 15 ccm fassendes Zentrifugenröhrchen. Der Kolben des Extraktionsapparates wird mit etwa 5 ccm Äther ausgespült, der Äther zum Alkohol gegossen, mit letzterem gut durchgemischt. Nun wird scharf abzentrifugiert, die klare Flüssigkeit zum Aceton im Meßzylinder gegossen, das Zentrifugenröhrchen mit etwas Äther nachgespült.

7. Die vereinigten Extrakte werden dreimal hintereinander mit je 10 ccm Petroläther ausgeschüttelt. Der sich glatt abscheidende Petroläther wird in den großen 150-ccm-Kolben gesogen.

8. Der Petroläther wird bei vermindertem Druck verdampft. Der Rest wird in 2 bis 3 ccm Aceton gelöst (Aceton in kleiner Spritzflasche), das Aceton in ein Zentrifugenröhrchen übertragen. Der Rest im Kolben wird noch zweimal mit ebensoviel Aceton tüchtig extrahiert, dann die im Röhrchen vereinigten Acetonextrakte abzentrifugiert.

9. Die klare Flüssigkeit wird in ein Kölbchen von 80 ccm übertragen, das Röhrchen einmal mit etwas Aceton nachgespült. Das Aceton wird vollständig verdampft, der Rest in etwa 5 ccm Petroläther gelöst. Nun wird ein Tropfen ätherischer Phenolphthaleinlösung zugesetzt und dann aus einer Pipette tropfenweise die petrolätherische Lösung des Natriumalkoholats (Zubereitung s. unten), bis die Flüssigkeit eine rote Farbe annimmt. Hierbei werden die Fettsäuren in ihre Na-Seife überführt. Nun muß man sehr schonend, also ohne höhere Temperatur, aber ganz vollständig eintrocknen. Besonders jede Spur von Alkohol muß entfernt werden. Man saugt also den Petroläther ab und erwärmt bei vollem Vakuum gelinde über dem Wasserbade, indem man einige Male Luft in das Kölbchen

läßt. Nun gießt man einige Kubikzentimeter Petroläther auf und saugt wieder in derselben Weise weg. (Der Alkohol muß aus dem Grunde so vollständig entfernt werden, weil er die Seifen petrolätherlöslich gestaltet.)

10. Nun wird der Kolben dreimal mit Petroläther in derselben Weise wie bei 8. mit Aceton extrahiert. Der in das Zentrifugenrohr übertragene Petroläther wird abzentrifugiert, die obenstehende Flüssigkeit weggesogen, das Röhrchen mit dem Niederschlag mit etwas Petroläther ausgespült. Die Seifen befinden sich nun im Kölbchen von 80 ccm und im Zentrifugenrohr.

11. Nun gießt man in das Kölbchen einige Kubikzentimeter Petroläther und setzt nun einen Tropfen Ameisensäure[1]) zu, schwenkt etwa 1 Minute lang gut um, bringt dann die Flüssigkeit in das Zentrifugenrohr, in dem sich noch der andere Teil der Seifen befindet. Den Kolben spült man noch einmal mit Petroläther nach, dem man wieder einen Tropfen Ameisensäure zusetzt. Das dritte Mal spült man nur mit Petroläther um. Im Zentrifugenrohr wird mit einem dünnen Glasstäbchen der Seifenniederschlag tüchtig aufgewirbelt. Dann zentrifugiert man, saugt die obenstehende Flüssigkeit in einen Kolben von 40 ccm und spült mit Petroläther nach. (Der Überschuß der Ameisensäure scheidet sich im Zentrifugenröhrchen gewöhnlich in Form eines Tröpfchens aus.)

12. Der Petroläther im Kölbchen wird abgedampft und auch die noch anwesende freie Ameisensäure vollständig weggesogen. Dies geschieht, indem man der Wasserstrahlpumpe vollen Strahl gibt, das Kölbchen gleichzeitig im Dampfe des Wasserbades gut erwärmt, während dessen man einigemal Luft einläßt.

13. Das Kölbchen wird dreimal mit je 2 bis 3 ccm Petroläther tüchtig ausgespült, der Petroläther in ein Zentrifugenrohr übertragen. Nun wird Petroläther-Natriumalkoholat zugesetzt, und zwar zuerst so viel, wie man vorher bei 9. zugesetzt hat. Nun überzeugt man sich, ob die Flüssigkeit bereits alkalisch reagiert. Dies kann derart geschehen, daß man ein ganz dünnes Streifchen Filterpapier, das man mit der ätherischen Phenolphthaleinlösung befeuchtet hat, eintaucht. Ist die Lösung noch nicht alkalisch, so wird in geringen Mengen von ein bis zwei Tropfen weiterer Petroläther-Natriumalkohol zugesetzt, bis die alkalische Reaktion erreicht wird. Die Seifen scheiden sich nun quantitativ aus. Nun wird zentrifugiert, die klare Flüssigkeit abgehebert und der Niederschlag einmal mit Petroläther gewaschen. Dann werden nochmals 2 bis 3 ccm Petroläther zugesetzt und der Niederschlag hierin aufgewirbelt. Nun gibt man aus der Tropfflasche einen Tropfen Ameisensäure zu, wirbelt den Niederschlag nochmals mit dem Glasstäbchen gut auf und zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit kommt in ein kleines Kölbchen. Der Rest im Röhrchen wird einmal mit Petroläther nachgespült. Die petrolätherische Lösung wird nun wieder vollständig abgedampft.

14. Der Rest wird in einer geringen Menge Aceton, etwa 0,5 ccm, gelöst. Das Aceton wird durch das Filtersaugröhrchen (Abb. 4) in das Wägegefäß gesogen. Das Kölbchen wird noch zweimal in derselben Weise ausgespült. Die in das Wägeröhrchen übertragene Flüssigkeit wird abgedampft, getrocknet und der Rest gewogen.

Zum Schlusse seien hier noch die zu einer Analyse nötigen Apparate und Chemikalien zusammengestellt, um ein Vorbereiten der Analyse zu erleichtern.

---

[1]) Essigsäure kann ebenfalls verwendet werden, läßt sich aber später wegen des höheren Siedepunktes weniger gut entfernen.

Chemikalien.

1. Bariummischung. Man löst 10 g $BaCl_2$ in 100 g 10proz. Essigsäure. Man bewahrt die Lösung in einer Tropfflasche auf.

2. Natriumalkoholat. 1 bis 2 g alkoholfreies Natriumalkoholat wird in einer Flasche (mit Glasstopfen) mit etwa 100 ccm Petroläther gut durchgeschüttelt. Dann läßt man den Überschuß des Alkoholats absitzen und entnimmt zur Reaktion mit seiner Pipette stets von der obenstehenden klaren Flüssigkeit. (Alkoholfreies Natriumalkoholat wird durch *C. A. F. Kahlbaum* in den Handel gebracht.)

3. 0,25proz. Lösung von Phenolphthalein in Äther, in Tropfflasche.

4. Aceton, in Flasche, für eine Bestimmung etwa 30 ccm.

5. Aceton in kleiner Spritzflasche.

6. Absoluter Alkohol etwa 25 ccm.

7. Äther, etwa 10 ccm.

8. Petroläther, 30 ccm. Zum Ausschütteln.

9. Petroläther in kleiner Spritzflasche. Dieser Petroläther darf keine Verunreinigung enthalten. Besonders ist Alkohol als Verunreinigung gefährlich. Man verwende sowohl bei 8., wie bei 9. nur niedrig siedenden Petroläther. Es ist klar, daß alle verwendeten organischen Lösungsmittel bei der Destillation keinen Rest zurücklassen dürfen, weswegen es auch unerläßlich ist, die Lösungsmittel vor dem Gebrauch einmal umzudestillieren.

10. Ameisensäure in Tropfflasche.

11. Fein granuliertes Zink.

Apparatur[1]).

1. 8 bis 10 ccm Rundfilter.

2. Etwa 10 cm breite und ebenso lange Stücke von gewöhnlichem, dünnem Filterpapier. Diese, wie auch die Rundfilter müssen vor dem Gebrauch 2 Stunden lang im Extraktionsapparat mit Alkohol extrahiert werden. Man extrahiert am besten zugleich eine größere Anzahl von diesen Papieren.

3. Extraktionsapparat mit elektrischem Heizkörper.

4. Ein Satz von Destillierkölbchen mit Kappe. Ein Satz besteht aus einem Kölbchen von 150, 80, 40 und zwei von 20 ccm. Alle Kölbchen passen zu derselben Kappe.

5. Eine etwa 1 ccm-Pipette, mit Ventilschlauch montiert.

6. Saugeröhrchen nach Abb. 2a, b, c, Lumen 0,5 bis 1,0 mm.

7. Ein Filtersaugröhrchen nach Abb. 4.

8. Ein gewöhnliches und ein dünnes Glasstäbchen.

9. Ein Zentrifugenrohr von etwa 15 ccm.

10. Drei Zentrifugenröhrchen von etwa 10 ccm.

11. Ein Wägeröhrchen nach Abb. 3.

12. Ein Meßzylinder von 50 ccm mit geschliffenem Glasstopfen.

13. Ein Bechergläschen von etwa 80 bis 100 ccm.

Analysenbeispiele.

Die ausgeführten Analysen sind in folgender Tabelle zusammengefaßt. Die Analysen waren derart angestellt, daß von einer größeren Portion

---

[1]) Extraktionsapparat, Heizkörper, Kölbchen (in Form eines doppelten Satzes mit Stativ), Wägeröhrchen werden für den Handel durch die Firma A. Dargatz, Hamburg, Pferdemarkt 66, angefertigt.

frischen defibrinierten Schweineblutes parallele Proben von je 10 ccm entnommen und analysiert wurden. Um festzustellen, ob die gefundene Substanz wirklich Fettsäure sei und der Fehler additiv oder prozentisch ist, wurden aus demselben Blute bei künstlicher Zugabe verschiedener Ölsäuremengen weitere Analysen ausgeführt.

In der Tabelle sind in Kolumne 1 die gefundenen Fettsäuremengen eingetragen. In der Kolumne 2 findet man die pro 10 ccm zugesetzte Ölsäuremenge. In Kolumne 3 steht die gefundene Fettsäuremenge nach rechnerischem Abzug der künstlich zugesetzten Ölsäure. Die zwei Analysenreihen, die an verschiedenen Blutproben angestellt waren, sind durch die horizontale Linie geschieden. Zahlen bedeuten Milligramm Fettsäure (in 10 ccm Blut).

1	0,66	—	0,66	8	0,56	—	0,56
2	0,44	—	0,44	9	0,70	—	0,70
3	0,75	—	0,75	10	2,52	1,90	0,62
4	1,86	1,26	0,60	11	2,48	1,90	0,58
5	1,80	1,26	0,54	12	2,21	1,90	0,31
6	1,62	1,26	0,36	13	4,14	3,80	0,34
				14	4,42	3,80	0,62
7	0,55	—	0,55	15	4,24	3,80	0,44

Man ersieht aus dem Resultate der angeführten 15 Bestimmungen, daß die größten Abweichungen in einer Analysenreihe, d. h.. die Differenz der erhaltenen größten und kleinsten Werte 0,40 nicht erreicht. Die größte Abweichung vom wahrscheinlichen Mittelwert ist also ungefähr 0,2 mg, so daß wir mit dieser Zahl auch die Grenze der Genauigkeit der Methode charakterisieren können. Nachdem der Fehler bei den größeren angewandten Fettsäuremengen ungefähr derselbe bleibt, können wir auch sagen, daß der genannte Fehler von 0,2 mg ein additiver und kein prozentueller ist. Nachdem die zugesetzten Fettsäuremengen mit demselben Fehler zurückgefunden wurden, können wir auch sagen, daß die ohne Fettsäurezusatz gefundene Substanz wirklich dem tatsächlichen Fettsäuregehalt des Blutes entspricht.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, die freien Fettsäuren von 10 ccm Blut mit einem Fehler von 0,0002 g gravimetrisch zu bestimmen[1]).

Literatur.

1) *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi*, Proc. Roy. Acad. Amsterdam **26**, 470—479, 1923. — 2) *Hoppe-Seyler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**, 503, 1883/84. — 3) *E. Abderhalden*, ebendaselbst **25**, 65, 1898. — 4) *I. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. Bergman 1922, II. A. — 5) *W. R. Bloor*, Journ. biol. Chem. **36**, 33, 1918. — 6) *I. C. Berntrop*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1902, S. 121. — 7) *M. Kumagawa* und *K. Suto*, diese Zeitschr. **8**, 212, 1908. — 8) *W. Kulka*, ebendaselbst **18**, 134, 1908. — 9) *C. Neuberg*, ebendaselbst **76**, 107, 1916. — 10) *Fr. Pregl*, Die quantitative organische Mikroanalyse, II. Aufl. Berlin, J. Springer 1923. — 11) *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **186**, 102, 1923.

[1]) Bei dem normalen Gehalt des Menschenblutes von 0,0002 ccm per Kubikzentimeter bedeutet dies einen Fehler von 10 Proz.

Der Nachweis der mehrfach ungesättigten freien hohen Fettsäuren im Blute.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Die Studien der chemischen Genese der perniziösen Anämie von *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi*[1]) ließen die nächste Ursache dieser Krankheit in den freien hohen Fettsäuren des Blutes vermuten, und zwar zeigte die Analyse, daß es gar nicht auf die totale Menge dieses Blutbestandteiles ankommt, sondern bloß auf die Fraktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die normal nur einen verschwindend kleinen Teil der an und für sich schon so geringen freien Fettsäurefraktion ausmachen konnte. Mit dieser Erkenntnis ergab sich dann auch die Notwendigkeit einer Methode ihres Nachweises. Es war aber von vornherein deutlich, daß die Ausarbeitung einer solchen Methode mit ganz außergewöhnlichen Schwierigkeiten verbunden war, da nicht nur die so geringen Fettsäuren aus dem Blute isoliert werden mußten, sondern es mußten noch weiter die mehrfach ungesättigten Fettsäuren von der überwiegenden Menge der so ähnlichen gesättigten Fettsäuren differenziert werden, und dazu mußten noch all die nötigen Manipulationen mit so labilen, leicht oxydablen Substanzen ausgeführt werden, wie es die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind, die eine sehr große Neigung zur Oxydation zeigen, bei der die doppelte Bindung und somit der einzige charakteristische Unterschied verschwindet, der der Angriffspunkt einer Isolierung sein könnte.

Der genaue quantitative Nachweis dieser Substanzen stößt aber auch noch auf andere, vorläufig ganz unüberwindbare Schwierigkeiten. Diese große Schwierigkeit liegt in erster Reihe in der sehr großen Unsicherheit unseres Wissens über die chemische Struktur der höher ungesättigten Fettsäuren des tierischen Körpers. Ist unser Wissen über die Zahl der doppelten Bindungen eine schon recht unsichere,

---

[1]) Proc. Roy. Acad. Amsterdam **26**, 470, 1923.

so tasten wir ganz im Dunkeln bei der Frage über ihre absolute und relative Stellung im Molekül. Dies ist aber bei der Beurteilung des Verhaltens einer Fettsäure ein sehr wesentlicher Punkt, haben doch die doppelten Bindungen dicht in der Nähe der Carboxylgruppe, also in α, β-Stellung, polar entgegengesetztere Eigenschaften, als die weiter in der Kette gelegenen, und haben kumulierte, d. h. benachbarte Doppelbindungen auch ganz besondere Eigenschaften. Weiterhin sei auf die große Verschiedenheit (auch in ihrer biologischen Wirkung) der trans-cis-Isomere der ungesättigten Fettsäuren hingewiesen.

All diese Schwierigkeiten bedingten, daß es uns nicht möglich war, eine ganz exakte Methode zu schaffen, die es gestattete, auf Grund der chemischen Analyse genauen zahlenmäßigen Aufschluß über die absolute Menge und Art der freien hohen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Blute zu geben, und wir uns endlich mit einer Methode begnügen mußten, die es uns gestattete, eine erhöhte Konzentration des Blutes an diesen Fettsäuren nachzuweisen. Leider ist es auch nicht gelungen, die Methode von subjektiven Faktoren zu befreien. Durch die große Oxydabilität der nachzuweisenden Verbindung ist man zu einem sehr raschen und trotzdem sehr vorsichtigen und exakten Arbeiten gezwungen, so daß die Beweiskraft des Resultates hier in noch höherem Maße wie bei anderen Analysen von der persönlichen Geschicklichkeit und speziellen Erfahrung des Untersuchers abhängen wird, die mehr Sicherheit bei der Beurteilung des Resultates bietet als die genaue Innehaltung der Vorschriften. Die Methode ist durch ihre Kompliziertheit auch völlig ungenügend, eine klinische Diagnosemethode zu bilden, und kann nur zur Erforschung der betreffenden Frage dienen.

Allgemeines über die Methode.

Man kann die chemischen Methoden, die zur Trennung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren von den gesättigteren dienen, in zwei Gruppen einteilen. Erstens in solche, die die Fettsäure als solche unverändert nachweisen und als Grundlage der Trennung die verschiedenen Löslichkeiten der Fettsäuren bzw. ihrer Salze benutzen. Leider wird aber durch die eintretenden zwei oder drei doppelten Bindungen in das große Fettsäuremolekül der Charakter der letzteren nicht in genügend scharfer Weise verändert, um hieran eine Mikromethode anzuknüpfen.

Weit bessere Aussichten bieten jene Methoden, die die doppelte Bindung benutzen, um an ihr zunächst eine Addition auszuführen und dann das in dieser Weise noch weiter veränderte Molekül zum Nachweis zu bringen. Eine solche bekannte und durchaus bequeme Methode ist die der Bromaddition, bei der an jede doppelte Bindung zwei Bromatome addiert werden. Die aus den ungesättigten Fettsäuren entstandenen Tetra-, Hexa- und Oktobromide haben bekanntlich ziemlich scharfe und typische Löslichkeiten.

Die ersten Studien über das Vorkommen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Blute, bei denen die allgemein angewendeten Methoden zur Isolierung der Fettsäuren mit nachfolgender Bromierung verwendet wurden,

zeigten, daß der betreffende Extrakt des Blutes bei der Bromierung stets einen geringen ätherunlöslichen Niederschlag gibt, aus welchem Befunde wir auf die Gegenwart mehrfach ungesättigter Fettsäuren im normalen Blute schlossen (l. c.). Das eingehende Beschäftigen mit dem Material belehrt uns aber, daß die Frage mit besonderen Schwierigkeiten verbunden sei und unsere „Fettsäurefraktion" noch nicht rein war, und daß das Blut normalerweise lipoide Substanzen enthält, die bei der Bromierung ebenfalls einen Niederschlag geben, trotzdem sie sicherlich keine höher ungesättigten Fettsäuren sind. Wir mußten also unsere erste Konklusion in Zweifel ziehen und die Frage des chemischen Nachweises einem eingehenden systematischen Studium unterziehen, das endlich zum Aufstellen der im vorhergehenden Stück beschriebenen Methode führte, die es ermöglicht, die freien Fettsäuren des Blutes mit Sicherheit rein darzustellen. Die in dieser Weise isolierte Fettsäurefraktion des normalen Blutes gibt, wie an anderer Stelle eingehend beschrieben werden soll, bei der Bromierung *keinen* Niederschlag, so daß wir im Gegensatz zu unseren ersten Befunden sagen können, daß das normale Blut keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren in durch unsere Methoden nachweisbaren Mengen enthält.

Unser Vorgehen war also das, daß wir erst die Fettsäuren in reinem Zustande isolierten und dann unter den isolierten Fettsäuren die mehrfach ungesättigten durch Bromaddition nachzuweisen suchten. Bei diesem Vorgehen hatten wir den Vorteil, daß wir uns auch zugleich über die Menge der totalen freien hohen Fettsäuren orientieren konnten. Wir werden diese Methode als *Methode A* beschreiben. Im Laufe der Arbeit haben wir nämlich die Methode noch etwas an die spezielle Aufgabe angepaßt und hierdurch die Methode etwas vereinfacht. Bei dieser *Methode B* verzichtet man aber auf die Bestimmung der freien totalen Fettsäurefraktion. Dies taten wir erst, nachdem wir uns unseren Erwartungen gemäß zweifelsohne überzeugen konnten, daß in der perniziösen Anämie die Menge der freien hohen Fettsäuren nicht vermehrt, eher noch vermindert ist, und daß hier ausschließlich die Menge der so gefährlichen höher ungesättigten Fettsäuren vermehrt ist. Bei einer Bestimmung der totalen freien Fettsäuren wird diese Vermehrung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die stets noch überwiegende Menge der gesättigten Fettsäuren verdeckt.

Bei der Beschreibung der Methode wollen wir, um Wiederholungen zu vermeiden, an die vorhergehende Mitteilung anschließen.

Die Methode.

Methode A. Ein Abweichen von den Vorschriften der allgemeinen Fettsäuremethode (s. vorhergehendes Stück) wird durch die relativ hohe Oxydabilität der ungesättigten Fettsäuren bedingt. Man muß also das Material möglichst rasch und möglichst schonend behandeln.

Hierauf wird man schon bei der Vorbereitung der Bestimmung Rücksicht nehmen. Man wird schon vorher alle Gefäße und Instrumente gebrauchsfertig stellen und sich für die Dauer der Analyse jede andere Arbeit aus dem Wege räumen. Man muß „Bahn frei" haben und die ganze Bestimmung in einem Zuge abarbeiten.

Weiterhin muß man trachten, das Material möglichst schonend zu behandeln, höhere Temperaturen nach Möglichkeit vermeiden und diese mit höherem Vakuum zu ersetzen. Wird doch an einigen Punkten der Präparierung eine höhere Temperatur zur genauen Trocknung nötig (z. B. beim Abdampfen des alkoholathaltigen Petroläthers), so beginnt man mit der

Erwärmung erst, wenn im Kölbchen schon ein höheres Vakuum (also eine geringe Sauerstoffspannung) erreicht ist. Man behebt dann das Vakuum auch erst, nachdem das Kölbchen wieder abgekühlt ist. Besonders streng wird man die höhere Temperatur vermeiden, wenn Verdacht besteht, daß das Material irgendwie feucht ist, d. h. Wasser enthält. In Gegenwart von Feuchtigkeit und Sauerstoff unterliegen die doppelten Bindungen besonders leicht der Oxydation.

Mit Rücksicht auf die Oxydabilität des Materials gestaltet sich die Extraktion etwas verschieden von der allgemeinen Methode der vorhergehenden Mitteilung. Dem Aceton, in das das Blut eingegossen wird, wird außer der Bariummischung noch ein Tropfen einer 1proz. KCN und zwei Tropfen einer ebenso starken, nicht zu alten Hydrochinonlösung zugesetzt[1]).

Nachdem man mit Aceton aufgekocht, filtriert und ausgepreßt hat, setzt man das Material wieder in dasselbe Becherglas ein, übergießt mit 30 ccm 96proz. Alkohol, das dieselben Zusätze enthält, wie das Aceton, dann verteilt man das Blut gleichmäßig, indem man dasselbe mit einem Glasstäbchen zerdrückt, kocht auf, hält den Alkohol am Wasserbad unter stetem Rühren 5 Minuten lang im Sieden, filtriert wieder und preßt gründlich aus. Beide Flüssigkeiten werden nun im großen 150-ccm-Destillierkolben vereinigt und unter vermindertem Druck auf etwa 40 ccm eingedampft, dann in einen mit geschliffenem Glasstopfen versehenen 50-ccm-Meßzylinder überführt. Der Kolben wird mit 10 ccm Petroläther nachgespült. Dieser Petroläther dient zur ersten Ausschüttelung der Flüssigkeit, auf die noch zwei weitere Ausschüttelungen folgen. Vor der Ausschüttelung wird im Zylinder die Luft durch Kohlensäure ersetzt, die man auch im weiteren Laufe der Präparierung in freigiebiger Weise mehrfach gebrauchen kann.

Diese Methode der Extraktion ohne Extraktionsapparat ist nicht quantitativ. Es wird aber nur wenig Lipcid zurückgehalten, soviel dem unausgepreßten Alkohol entspricht. Da durch die Alkoholbehandlung alle Lipoide freigemacht sind, sind im Reste alle Lipoide gleichmäßig beteiligt, und es besteht keine Gefahr, daß eben die gesuchte Substanz, die Fettsäure, spezifisch zurückgehalten ist.

Weiter gestaltet sich die Methode, wie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben. Wir verweisen auf die dortigen Angaben und schließen nun bei dem Punkte an, wo wir das Material im Wägeröhrchen trocken in Händen haben. Die Trocknung wird man natürlich schonend vornehmen und nicht den Trockenschrank zu diesem Zwecke benutzen, sondern die Dampftrocknung vorziehen. Wird die Substanz nicht gewogen oder der Schmelzpunkt bestimmt, so wird man auf absolute Trockenheit auch kein besonderes Gewicht legen müssen.

Wir haben also unsere Substanz in trockenem Zustande im Wägeröhrchen. Nun wird das Röhrchen in gemahlenes Eis gesetzt und auf 0° gekühlt. Nun gießt man etwa $^1/_4$ ccm Äther zu, der vorher ebenfalls abgekühlt wurde, und überzeugt sich mit seiner Lupe, ob sich das Material tadellos klar aufgelöst hat. Ist dies nicht der Fall, so zentrifugiert man zwischen Eis ab und saugt in ein zweites Wägeröhrchen um, indem man mit einigen Tropfen Äther nachspült. An Stelle des Zentrifugierens kann man auch das Filtersaugeröhrchen benutzen.

---

[1]) Man kann die Hydrochinonlösung durch Ansäuern mit etwas Essigsäure relativ haltbar machen. Das Hydrochinon hat schon in kleinen Mengen einen sehr deutlichen, schützenden Einfluß auf die Fettsäuren in bezug auf ihre Oxydation.

Haben wir nun unser Material in einer tadellosen ätherischen Lösung, so wird wieder in Eis gekühlt. Nun setzen wir unter steter Kühlung aus einer dünnen Kapillare in kleinen Tropfen Brom zu, bis die Flüssigkeit deutlich braun gefärbt ist. Zwischen den einzelnen Tropfen sorgt man durch Umschwenken für eine gleichmäßige Verteilung des Broms. Hierbei entstehen nun aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren die ätherunlöslichen Polybromide. Nun beobachtet man von Zeit zu Zeit sein Material mit seiner Lupe auf Bildung eines Niederschlages und setzt etwa nach 1 Stunde in den Eiskasten und läßt hier über Nacht stehen, um am folgenden Tage nochmals die Präzipitatbildung zu beobachten.

Wie an anderer Stelle ausführlicher besprochen werden soll, gibt normales Blut unter diesen Umständen nie ein Präzipitat, hat also keinen nachweisbaren Gehalt an höher ungesättigten Fettsäuren. Ist jedoch der Gehalt des Blutes an diesen Fettsäuren erhöht, so wie wir es wiederholt im hämolytischen Stadium der perniziösen Anämie sahen, so erscheint einige Minuten nach der Bromzugabe eine Trübung, die man mit seiner Lupe gut beobachten kann. Bald entsteht danach ein sehr deutlicher, flockiger Niederschlag, der sich im Laufe einer Stunde zu Boden setzt und das typische flockige Aussehen der Fettsäurebromide hat.

Natürlich ist die absolute Menge dieses Niederschlages sehr gering, ohne Lupe oft auch nicht gut sichtbar, so daß eine quantitative Bestimmung dieser Substanz an der *Kuhlmann*schen Wage nur bei verfeinerter Wägemethode möglich ist. Zur Wägung dieses Materials haben wir ein besonderes Wägeröhrchen konstruiert, das das Wägen bis zur sechsten Dezimale ermöglicht und in einem der nachfolgenden Aufsätze beschrieben werden soll (S. 302). Es sei aber hier zugleich bemerkt, daß eine solche zahlenmäßige Bestimmung nur sehr beschränkten Wert hat, auch schon aus dem Grunde, weil Tetra-, Hexa- und Oktobromide durch das Eintreten des schweren Broms sehr verschiedene Gewichte haben im Gegensatz zu den entsprechenden zwei-, drei- und vierfach ungesättigten Fettsäuren, die praktisch gleich schwer sind. Darum kann man sich mit der Schätzung des Niederschlages begnügen — ob viel oder wenig —, da die Bedeutung des Niederschlages auch ohne zahlenmäßige Angabe um so deutlicher hervortritt, da doch normales Blut keine mehrfach ungesättigte Fettsäure in nachweisbarer Menge enthält und somit jedem Niederschlage eine pathologische Bedeutung zukommt.

Soweit wir sehen konnten, ist der Bromniederschlag in heißem Benzol nur teilweise löslich, löst sich nur sehr wenig in kaltem Benzol, so daß wir es hier bei den pathologischen höher ungesättigten Fettsäuren, hauptsächlich mit Fettsäuren mit drei und vier doppelten Bindungen zu tun haben, die also der im Aufbau der Phosphatide beteiligten Linolen- und Arachidinsäure entsprechen würde.

Die Grenze der Niederschlagsbildung liegt etwa bei einem Gehalt der ätherischen Lösung an 0,02 mg Linolensäure. Wahrscheinlich liegt die Löslichkeitsgrenze der oktobromierten Arachidinsäure noch viel tiefer, so daß viel geringere Mengen dieser Fettsäure einen Niederschlag geben.

Methode B. Diese ist etwas schonender, gestattet aber, wie gesagt, keine Bestimmung der totalen freien Fettsäuren.

Vorbereitung, Entwässerung wie bei Methode A. Ebenso laufen auch die ersten Momente der Präparierung bis zum Punkte 11 der vorhergehenden Publikation. Nun extrahiert man aber an Stelle von ameisensaurem Petroläther mit Petroläther, dem 5 Proz. 98proz. Alkohol zugesetzt wurde. Die Seifen der höher ungesättigten Fettsäuren gehen hier glatt in Lösung.

Man zentrifugiert und bringt die obenstehende Flüssigkeit in ein kleines Kölbchen, destilliert *vollständig* (!) ab. Zur Sicherheit gießt man nun einige Kubikzentimeter reinen Petroläther auf, schwenkt einigemal gut um, verdampft dann auch diesen Petroläther vollständig. Ist das Material nun im Kölbchen ganz trocken, daher auch alkoholfrei, so extrahiert man dreimal mit reinem Petroläther und zentrifugiert die abgegossene Flüssigkeit. Die gesuchten Seifen befinden sich nun im Kolben und im Zentrifugat. Hat man die obenstehende Flüssigkeit abgegossen, so extrahiert man den Kolben mit ameisensaurem Petroläther, wie in Punkt 11 der vorhergehenden Mitteilung beschrieben. Ebenso folgt man dem Punkte 12. Die Manipulationen des Punktes 13 werden weggelassen, und man fährt fort mit dem Vorgange des Punktes 14. Weiterhin ist die Methode dieselbe wie Methode A.

Studien über die biologische Oxydation.

I. Mitteilung:

Über die Sauerstoffaufnahme des Systems Linolensäure—SH-Gruppe.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

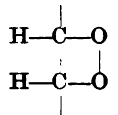
(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Band 199 des *Pflüger*schen Archivs (S. 531 bis 566) wurde von *O. Meyerhof* eine eingehendere Analyse des von *Meyerhof* und von *F. G. Hopkins* beobachteten thermostabilen Atmungssystems der Zellen gegeben. Hierbei wurde gezeigt, daß der Sauerstoff in diesem System unter dem katalytischen Einfluß der SH-Gruppe auf die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Gewebe bzw. der Phosphatide übertragen wird.

Es ist wohl klar, daß es sich hier um eine Beobachtung fundamentaler Bedeutung handelt, die sowohl für die allgemeine Theorie der Oxydation, wie für die speziellere Frage der Oxydation der Fette und der biologischen Bedeutung der Phosphatide die weitgehendsten Konsequenzen trägt. Nachdem die Linolensäure bei der Spontanoxydation mit dem Sauerstoff ein Peroxyd bildet und *Meyerhof* fand, daß auf eine verschwindende Doppelbindung zwei Atome Sauerstoff aufgenommen werden, nimmt er mit Wahrscheinlichkeit für das Oxydationsprodukt die folgende Formel an:



nach der also als Oxydationsprodukt der Linolensäure bei SH-Katalyse dasselbe *Peroxyd* wäre, das auch bei der Spontanoxydation gebildet wird.

Nachdem die Eigenschaften und Reaktionen dieses Peroxyds dem Verfasser aus den Studien von *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi* über die Genese der perniziösen Anämie bekannt waren und es auch diese Studien wünschenswert machten, Näheres über das Schicksal und die Bedeutung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu erfahren, wurde versucht, den experimentellen Beweis für die obige *Meyerhof*sche Formel zu erbringen.

Bekanntlich ist das Peroxyd, das die Linolensäure bildet, chemisch sehr aktiv. Es vermag auch ohne Gegenwart von Katalysatoren die HJ-Säure glatt zu Jod und Wasser zu oxydieren, wozu selbst Wasserstoffperoxyd nicht befähigt ist. Sie oxydiert in Gegenwart von Katalysatoren (Hämoglobin) Hydrochinon, Pyrogallol, Benzidin zu ihren gefärbten, leicht erkennbaren Oxydationsprodukten.

Es wurde also die Linolensäure unter Mitwirkung der von *Meyerhof* empfohlenen Thioglykolsäure oxydiert (Technik siehe weiter unten), das Oxydationsprodukt von der Thioglykolsäure isoliert und auf ihre Reaktionen untersucht. In den drei diesbezüglichen, voneinander unabhängigen Versuchen ergab sich einstimmig das für uns so überraschende Resultat, daß die unter Mitwirkung der SH-Gruppe oxydierte Linolensäure keine der obigen Peroxydreaktionen gab. Nachdem die Kontrollversuche, in denen an Stelle der Linolensäure Linolensäureperoxyd als Ausgangsmaterial diente, zeigten, daß das Peroxyd unter den angewandten Versuchsbedingungen beständig ist und als Peroxyd mit den obigen Reaktionen leicht nachweisbar bleibt, konnten wir aus unseren Versuchen nur den Schluß ziehen, daß es sich hier nicht um ein Peroxyd handelt und die Linolensäure bei katalytischer Oxydation durch SH nicht ihr normales Oxydationsprodukt, das Peroxyd, bildet und den Sauerstoff in irgend einer anderen Form bindet.

Bei diesem eingehenderen Beschäftigen mit dem Material ist es auch deutlich geworden, daß für eine weitere Verfolgung dieser so bedeutenden, von *Meyerhof* begründeten Frage eine sichere Kenntnis der Formel des Oxydationsproduktes unerläßlich ist. Währenddessen die Kenntnis dieser Formel einerseits weitgehende biologische Konsequenzen trägt, scheint ohne diese jede weitere Folgerung verfrüht, selbst wenn es sich auch nur um die naheliegendsten Folgerungen handelt, die sich auf die direkte zahlenmäßige Verfolgung des Prozesses stützen.

Verfasser hat sich die Aufgabe gestellt, diese Frage näher zu untersuchen, und glaubt zu einer befriedigenden Lösung gekommen zu sein, worüber in der vorliegenden Arbeit berichtet werden soll.

Oxydation der Linolensäure und Isolierung des Oxydationsproduktes.

Nach dem Vorgange von *O. Meyerhof* wurde als SH die Thioglykolsäure (abgekürzt Thgs.) und die Linolensäure (abgekürzt Lls.) verwendet[1].

Nach dem Vorgange *Meyerhofs* wurde die Lls. in der schwach essigsauren Lösung der Thgs. suspendiert und bei 37° C geschüttelt. Die Bindung des Sauerstoffs war aber unter diesen Bedingungen derart langsam, daß bei der nötigen langen Versuchsdauer befürchtet werden mußte, daß wir endlich die Produkte der Spontanoxydation der Lls. erhalten. Wir hatten Grund zu denken, daß dieses von *Meyerhof* abweichende Resultat durch die größere angewandte Lls.-Menge (3 bis 4 ccm) verursacht wurde, die eine ungenügende

[1]) Beide Präparate wurden von *Kahlbaum* bezogen.

Dispersität bedingte. Um der Lls. also die nötige große stabile Oberfläche zu geben, wurde die folgende, besonders einfache Methodik angewandt, die dann auch eine den *Meyerhof*schen Angaben entsprechende energische Oxydation bzw. Sauerstoffaufnahme ergab.

Die Lls. wurde in ätherischer Lösung in ein etwa 300 ccm großes Stück dicken, weichen Flußpapieres eingesogen. Nach Verdampfen des Äthers bleibt die Lls. mit der gewünschten großen stabilen Oberfläche im Papiere zurück. Dieses wurde nun mit der Thgs. in einen mit Sauerstoff gefüllten Glaszylinder geschlossen, der mit einem Gasometer in Verbindung stand und für die Zeit des Versuchs im Wasserbade versenkt wurde. Der mit O_2 gefüllte Gasometer gestattete eine grobe Ablesung des verbrauchten Sauerstoffvolumens.

Nach dem Ablauf der Oxydation wurde das Papier extrahiert, das entstandene petrolätherunlösliche Oxydationsprodukt der Lls. (abgekürzt Olls.) wird von dem wahrscheinlich unveränderten petrolätherlöslichen Rest der Lls. getrennt und von der Thgs. isoliert. Die detailliertere Versuchsanordnung war die folgende:

Versuch 1. 4 ccm Lls. werden in 16 ccm Äther gelöst und in Papier gesogen. Nach Verdampfen des Äthers wird das Papier mit 30 ccm 10proz. Thgs. (Thgs. gelöst in n/300 Essigsäure) befeuchtet und in den Zylinder geschlossen. Temperatur des Wasserbades 34° C. Der O_2-Verbrauch ist in der Kurve 1 des Diagramms dargestellt. Dem Wasserbade entnommen, wird der Zylinder über Nacht in den Eiskasten gestellt, dann wird das Papier mit etwa 250 ccm Wasser extrahiert, dem bis zur bleibenden Phenolphthaleinrotfärbung Ammoniak zugesetzt wurde. Dann wurde mit $BaCl_2$ versetzt und das ausscheidende Ba-Salz der Fettsäure abzentrifugiert. Das Zentrifugat wird dreimal mit Wasser gründlich gewaschen (je 150 ccm), dann unter Zugabe von wenig verdünnter Schwefelsäure und Alkohol zweimal mit Benzol, einmal mit Benzoläther extrahiert bzw. ausgeschüttelt. Die vereinigten benzolhaltigen Extrakte werden unter vermindertem Druck eingedampft, der Destillationsrückstand mit Petroläther gründlich extrahiert.

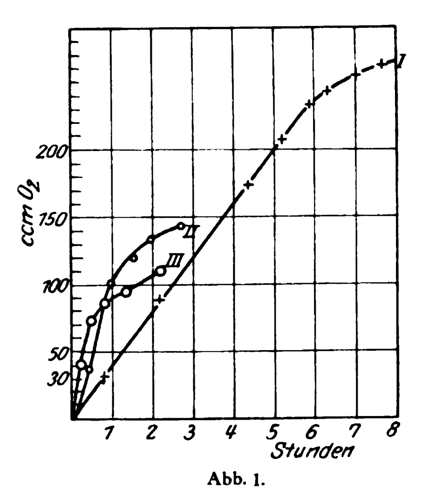


Abb. 1.

Der isolierte petrolätherlösliche Teil ist ein leichtflüssiges, schwachgelbes Öl, das in seinem ganzen Erscheinen der Ausgangssubstanz der unoxydierten Lls. gleicht und eine starke Hexabromidreaktion gibt. Dieser Teil wird nicht weiter untersucht.

Der petrolätherunlösliche Teil (Olls.) ist ein dunkelgelbes, sehr dickflüssiges Öl. Es löst sich glatt und klar in Aceton, absolutem Alkohol, Benzolalkohol, unter Trübung in Äther und Benzol.

Versuch 2. 2 ccm Lls. und 1 ccm Thgs. werden gemengt, die Mischung in 12 ccm Äther gelöst, in Papier gesogen. Letzteres wird mit 20 ccm n/100 Essigsäure befeuchtet. Temperatur im Wasserbad 40°. Sauerstoffverbrauch

auf 4 ccm Lls. berechnet (mit 2 multipliziert), s. Kurve 2 des Diagramms. Nach der Oxydation wird das Papier mit 100 ccm Wasser extrahiert, dem, wie in Versuch 1, Ammoniak zugesetzt wurde, der Extrakt mit $BaCl_2$ gefällt, scharf zentrifugiert. Das Zentrifugat wird mit Äther und dann bis zur sauren Reaktion mit Ameisensäure versetzt. Das sich abscheidende Wasser wird wegzentrifugiert und die ätherische Fettsäurelösung bei vermindertem Druck abgedampft. Dann wird mit Petroläther fraktioniert. Petrolätherlöslicher Teil wie im Versuch 1. Der petrolätherunlösliche Teil wird in 70 ccm ammoniakalischem Wasser gelöst, mit $BaCl_2$ gefällt, das abzentrifugierte Präzipitat wie oben mit ameisensaurem Äther extrahiert, der Äther verdampft, der Rest nochmals mit Petroläther extrahiert. Rest (Olls.) Aussehen wie im Versuch 1.

Versuch 3. 3 ccm Lls. und 1,5 ccm Thgs. im selben Äther gelöst, in Papier gesogen. Nach Verdampfen des Äthers zeigt eine deutliche Erwärmung des Papiers, daß die Oxydation auch ohne Wasserzusatz erfolgt. Papier wird unbefeuchtet in den Zylinder eingeschlossen, bei Zimmertemperatur belassen. O_2-Verbrauch auf 4 ccm Lls. berechnet. Siehe Kurve 3 des Diagramms.

Das Papier wird im Siedepunktsextraktionsapparat in CO_2-Atmosphäre unter Zugabe von wenig absolutem Alkohol mit Äther extrahiert. Extrakt wird bei vermindertem Druck eingedampft, mit Petroläther extrahiert. Rest wird in ammoniakalischem Wasser gelöst, mit $BaCl_2$ gefällt, zentrifugiert, Fettsäure mit Ameisensäure freigemacht und mit Benzolalkohol und Ätheralkohol extrahiert. Vereinigte Extrakte werden eingedampft, nochmals gründlich mit Petroläther extrahiert. Rest (Olls.) wie im Versuch 1 und 2.

Mit den derart erhaltenen drei Präparaten werden zur Klärung der Formel der Olls. die folgenden Analysen ausgeführt.

Molekulargewichtsbestimmung.

0,060 bis 0,120 g der Olls. werden in 4 ccm Methylalkohol gelöst, dann in Gegenwart von Phenolphthalein mit n/500 NaOH titriert. Da der Farbenumschlag wegen der Dissoziation der Na-Seifen nicht sehr scharf ist, wurden nach Eintreten der bleibenden Rotfärbung einige Tropfen einer starken $BaCl_2$-Lösung zugesetzt und, wenn nötig, die NaOH-Zugabe fortgesetzt. Der Farbenumschlag ist unter diesen Bedingungen ziemlich scharf zu erkennen. Die Titration geschieht aus der *Pregl*schen Mikrobürette. Für den Verbrauch des Blindversuches wird Korrektion genommen. Die gefundenen Molekulargewichte sind die folgenden:

	Gefunden	Mol.-Gewicht Lls. +
Versuch 1	294	= 276 + 18
Versuch 2	295	= 276 + 19
Versuch 3	291	= 276 + 15
Mittelwert	293	= 276 + 17

Wie aus den erhaltenen Zahlen ersichtlich, sind die Abweichungen vom Mittelwert nicht größer als 1 Proz., was ungefähr dem gemittelten Fehler der Methode entspricht. Die erhaltenen Molekulargewichte zeigen eindeutig, daß auf 1 Mol. Lls. stets nur 1 Atom Sauerstoff auf-

genommen wurde. Auf Grund dieses Befundes wäre also die Bildung eines Peroxyds ebenfalls auszuschließen. Es bleiben also folgende Formeln als a priori wahrscheinlich übrig:

```
    1.              2.            3.
    |               |             |
H—C—OH             C=O         H—C\
   ||               |             | >O
   C—H           H—C—H         H—C/
   |                |             |
  Enol            Keton     Äthylenoxyd.
```

Zur Entscheidung wurden folgende weitere Versuche ausgeführt.

Acetylierung.

60 bis 120 mg Olls. werden in den a. a. O.[1]) beschriebenen Destillierwägeröhrchen gewogen, dann 1 ccm Pyridinessigsäureanhydrid zugesetzt, eine Viertelstunde im Dampfe des Wasserbades erhitzt, dann nach Abkühlung mit n NaOH aus der Mikrobürette titriert (Indikator Phenolphthalein). Parallel wird ein Blindversuch einerseits ohne Fettsäure, andererseits ohne Pyridinessigsäure ausgeführt und am Resultat die entsprechende Korrektion vorgenommen. Die Methode wird vorher auf ihre Leistungsfähigkeit mit Glycerin geprüft. Der Versuch wird mit der Olls. des Versuches 1 und 2 sowie eines dritten hier nicht beschriebenen Versuchs ausgeführt. Alle drei Versuche waren negativ, und die Titration ergab die theoretischen Werte ohne jeden Schwund von Säurevalenzen.

Es wird also durch Olls. keine Essigsäure addiert, weshalb auch die Anwesenheit einer OH-Gruppe mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist.

Verhalten gegen $FeCl_3$.

Die Olls. wird in alkoholischer Lösung mit $FeCl_3$ behandelt. Es zeigt sich keine Rotfärbung. Wiederholte Versuche stets negativ. Nachdem die Reaktion mit $FeCl_3$ eine ziemlich zuverlässige Reaktion der Enole darstellt, ist auch die Anwesenheit eines Enols mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Verhalten gegen Phenylhydrazin.

Die Olls. wird in wässerig-alkoholischer Lösung mit essigsaurem Phenylhydrazin am Rückflußkühler mehrere Stunden lang gekocht. Das Produkt wird vom Hydrazin durch wiederholtes Waschen mit Wasser und Umfällung über das Bariumsalz gereinigt. Dann wird das Material in der Mikrodumas-Analyse auf seinen Stickstoffgehalt geprüft. Das erhaltene Material zeigt sich in der Mikrodumas-Analyse bei beiden Versuchen (Olls., Versuch 2 und 3) vollkommen N-frei, so daß die Bildung eines Hydrazons mit Sicherheit auszuschließen ist. Hierdurch wird auch die Anwesenheit eines Ketons bis zu einem gewissen Grade unwahrscheinlich.

Unter diesen Umständen bliebe also die Formel 3 des Äthylenoxyds als die wahrscheinlichste übrig. Die Formel ist durch ihre wohlbekannten Reaktionen einer direkten Prüfung zugänglich. Es wurden in dieser Richtung folgende Versuche ausgeführt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 1924.

Verhalten gegen $MgCl_2$ und $FeCl_3$.

Alkylenoxyde reagieren mit starker $MgCl_2$-Lösung nach der Formel:

$$2\begin{array}{l}\mathrm{H{-}\overset{|}{C}}\\ \quad\;\; \rangle O \\ \mathrm{H{-}\underset{|}{C}}\end{array} + 2\,H_2O + MgCl_2 = 2\begin{array}{l}\mathrm{H{-}\overset{|}{C}{-}Cl}\\ \quad\;\; | \\ \mathrm{H{-}\underset{|}{C}{-}OH}\end{array} + Mg(OH)_2,$$

wobei die Ausscheidung von Magnesia beobachtet wird. Analog verläuft die Reaktion mit $FeCl_3$.

In unserem Falle war die Reaktion durch den Umstand gestört, daß das entstandene Hydroxyd mit der Carboxylgruppe reagieren und hierbei eine Seife geben muß. Bei Fe wird eine solche Reaktion durch die relative Unlöslichkeit der entsprechenden Seife wohl erkennbar, hingegen wird durch die relative Löslichkeit der Mg-Seifen die Reaktion verdeckt. Dementsprechend haben wir beim Kochen der Olls. mit $FeCl_3$ in wässerig-alkoholischer Lösung bei Erwärmung eine deutliche Trübung beobachtet, die beim Abkühlen noch stärker wurde. Nachdem die Trübung oder Niederschlagsbildung bei Kochen mit $MgCl_2$ ausblieb, versuchten wir die Reaktion titrimetrisch zu verfolgen, muß doch die Bildung von $Mg(OH)_2$ mit einer Abnahme des Säuretiters einhergehen. Der Versuch wurde also folgendermaßen angestellt.

1,00 ccm einer ungefähr 6proz. alkoholischen Olls.-Lösung werden in einem kleinen Kolben mit 1,00 ccm einer $MgCl_2$-Lösung versetzt (die durch Verdünnen einer konzentriert-wässerigen $MgCl_2$-Lösung mit gleichen Teilen Alkohol gewonnen wurde). Es werden zwei parallele Versuche angestellt. Der Inhalt des einen Kölbchens wird sofort mit n/500 NaOH bei Gegenwart von Phenolphthalein titriert. Das andere Kölbchen wird am Wasserbade bis zum Kochen erwärmt, dann eine Viertelstunde lang am Rande des Wasserbades belassen. Der hierbei verdampfende Alkohol wird ersetzt. Dann wird abgekühlt und titriert. Verbrauch n/20 NaOH unerwärmt 3,80, erwärmt 3,55 ccm. Es zeigt sich also der sehr deutliche Verbrauch von 0,45 ccm, so daß die Reaktion als positiv bezeichnet werden kann. Kontrollversuch mit Lls. negativ.

Verhalten gegen Tollens Reagens.

Tollens Silberreagens wird durch Aldehyde und Äthylenoxyde reduziert, von welchen hier nur die letzteren in Betracht kommen konnten. Der Versuch zeigte, daß das Reagens durch die Olls. bereits in der Kälte reduziert wird. Schon bei relativ geringer Erwärmung wird die Reduktion sehr intensiv, wobei sich ein dicker Silberspiegel bildet. Lls. gibt die Reduktion nicht.

Spaltung des Äthylenoxydringes durch Säuren.

Besonders typisch und entscheidend ist das Verhalten der Äthylenoxyde Säuren gegenüber, durch die der Ring unter Bildung eines Glykols gespalten wird, wobei sich die Monoester des entstandenen Glykols bilden. Diese Reaktion mußte sich in unserem Falle neben der entsprechenden Veränderung der Eigenschaften des Materials in dem Anstieg des titrimetrisch festgestellten Molekulargewichtes auf ungefähr das Doppelte kundgeben.

270 mg Olls. werden in 2 ccm Methylakohol gelöst, dann 2 ccm Wasser und zwei Tropfen 10proz. H_2SO_4 zugegeben, die Mischung in einem zu-

geschmolzenem Röhrchen im kochenden Wasserbade 6 Stunden lang erwärmt. Im Laufe der Reaktion scheidet sich das anfangs ziemlich lösliche Öl in einer flüssigen Masse aus, die mehrmals aufgeschüttelt wird. Nach Ablauf der genannten Zeit wird das Röhrchen geöffnet und zentrifugiert. Das sich abscheidende Öl wird in Wasser aufgeschüttelt, nochmals an der Zentrifuge ausgeschieden, dann in sein Bariumsalz überführt, aus diesem isoliert und dann das Molekulargewicht nach der obigen Methode bestimmt.

Das derart isolierte Reaktionsprodukt hat von dem Ausgangsmaterial wesentlich abweichende Eigenschaften. Seine Na-Seife ist in Wasser nur schlecht, unter Trübung löslich (Na-Seife der Olls. in Wasser klar löslich), und sein Ba-Salz ist gegenüber dem festen Niederschlag des Ausgangsmaterials eine dicke Schmiere. Beide Eigenschaften weisen auf ein relatives Zurücktreten der Carboxylgruppe. Die Molekulargewichtsbestimmung ergibt ein Gewicht von 551, also ungefähr das Doppelte des des Ausgangsmaterials. Die Olls. zeigt also auch an diesem Punkte das für Äthylenoxyde typische Verhalten.

Verhalten gegen Jod.

Auf Grund der oben angeführten Versuchsreihe halten wir uns zu dem Schluß berechtigt, daß es sich hier tatsächlich um ein Alkylenoxyd handelt und der Sauerstoff somit unter Katalyse der SH-Gruppe durch die Lls. in dieser Ringform aufgenommen wird. Wir haben nun noch das Verhalten dem J gegenüber untersucht.

Über die Formel des Olls. konnte diese Reaktion nicht viel aussagen, da doch auch die genaue Untersuchung der entsprechenden Bindung durch die starke J-Adsorption der noch anwesenden beiden doppelten Bindungen gestört werden mußte. Diese Reaktion ist aber von unserem Standpunkte aus darum von Bedeutung, weil der Schwund der doppelten Bindungen bei der Oxydation durch *Meyerhof* ebenfalls durch diese Methode untersucht wurde. Nachdem *Meyerhof* durch Messen der O_2-Adsorption und der Jodzahl auf eine verschwindende Doppelbindung mehr als ein Atom O aufgenommen findet, hält er die Bildung einer Oxyfettsäure für unmöglich. Aus demselben Grunde wäre aber auch die Annahme eines Äthylenoxyds ebenfalls auszuschließen, da doch hier auf eine doppelte Bindung ebenfalls nur ein Atom O aufgenommen wird.

Handelt es sich aber wirklich um ein Äthylenoxyd, so ist es deutlich, daß die Methode der Jodaddition keinen Aufschluß über die Anzahl der verschwundenen Doppelbindungen aussagen kann. Bekanntlich werden die Äthylenoxyde durch HJ im Sinne der Formel

$$\begin{matrix} | \\ H-C \\ | \\ H-C \\ | \end{matrix}\!\!>O + 2\,JH = \begin{matrix} | \\ H-C-J \\ | \\ H-C-J \\ | \end{matrix} + H_2O$$

gespalten. Nachdem in einer Jodlösung stets HJ (ebenso wie in einer HJ-Lösung stets J) anwesend ist, steht zu erwarten, daß das ent-

standene Alkylenoxyd in demselben Maße Jod bindet, als ob es die unoxydierten Doppelbindungen enthalten würde. Eine Verringerung der Jodzahl ist durch Erhöhung des Molekulargewichtes um etwa 5 Proz. nur in sehr beschränktem Maße zu erwarten.

In unseren Versuchen wurde die Jodzahl mit dem Ausgangsmaterial (Lls.) und der Olls. im Versuch 2 und 3 bestimmt, im ersteren Falle mit der *Hübl*schen, im zweiten Falle mit der *Hübl-Walle*schen Lösung. Das Material wurde in beiden Fällen mit einer 11-cmm-Auswaschpräzisionsmikropipette abgewogen. Die überschüssige Jodmenge wurde mit 0,91 n Thiosulfatlösung zurücktitriert. Die Genauigkeit der Methode war ungefähr 6 Proz. Die Titration zeigt, daß die Jodzahl im Versuch 2 bei der Oxydation der Lls. zu Olls. praktisch unverändert geblieben ist, während sie im Versuch 3 um 10 Proz. abnahm. Aus diesen Versuchen läßt sich also schließen, daß das Jodadditionsvermögen durch die Oxydation, der Erwartung gemäß, nicht abgenommen hat. Wäre durch die Oxydation das einer doppelten Bindung entsprechende Jodbindungsvermögen verloren gegangen, so hätten wir das sehr deutliche Sinken der Jodzahl um mehr als 30 Proz. beobachten müssen.

Während also auch dieses Verhalten mit der Alkylenoxydformel in gutem Einklang steht, können wir sagen, daß bei diesem Problem das durch Jodaddition gemessene Additionsvermögen keinen Aufschluß über die Zahl der verschwundenen doppelten Bindungen geben kann. Wodurch das durch *Meyerhof* gefundene Sinken der Jodzahl bedingt war, kann nicht gesagt werden. Möglicherweise handelte es sich um sekundäre Reaktionen.

Als wesentliches Resultat möchten wir aber aus diesen Versuchen nur die Folgerung ziehen, daß unsere Versuchsresultate und auch die Annahme einer Alkylenoxydbindung in keinem prinzipiellen Gegensatz zu den Resultaten der von *Meyerhof* ausgeführten Messungen stehen.

Allgemeines über die Äthylenoxydbindung.

Da die Äthylenoxydbindung in der organischen Chemie relativ selten angetroffen wird, schien die Annahme einer solchen Formel etwas Unerwartetes, Ungewohntes zu sein. Beim näheren Überlegen haben wir diesen Eindruck aber nicht nur verloren, sondern kamen sogar zu der Anschauung, daß das Entstehen einer solchen Bindung auf Grund der bekannten Tatsachen logisch erwartet werden mußte.

„Wir müssen uns bei der theoretischen Behandlung des Sauerstoffmoleküls von vornherein der Tatsache bewußt sein, daß in dem System $O=O$ jeder Eingriff in erster Linie die Doppelbindung, ganz im gleichen Sinne wie beim Äthylen $H_2C=CH_2$, auf dem Wege der Addition zu lösen hat und daß erst von dieser primären Reaktionsphase aus die Zerlegung zwischen den beiden Sauerstoffatomen erfolgen kann. Das

Prinzip dieser Reaktionsweise wird am einfachsten Beispiel, an der Bildung des Wassers aus den Elementen, sofort klar. Hier ist das primäre Auftreten von Hydroperoxyd durch neue Untersuchungen sichergestellt: $O{=}O + H_2 \rightarrow HO{-}OH$[1]).“

Aus demselben Grunde können wir mit *F. G. Hopkins* erwarten, daß sich aus der SH-Gruppe bei der Bindung des zu übertragenden Sauerstoffs primär ein Peroxyd, namentlich ein Hydroperoxyd bildet. Hat dieses Gelegenheit, auf eine doppelte Bindung einzuwirken, so können wir auf Grund der Untersuchungen von *N. Prileschajev*[2]) erwarten, daß beide miteinander glatt reagieren und der Sauerstoff an der doppelten Bindung unter Bildung eines Äthylenoxyds addiert wird. Diese Reaktion verläuft unter Verwendung von Hydroperoxyden derart glatt, daß sie vom genannten Autor zum Nachweis von doppelten Bindungen empfohlen wird[3]).

Unsere, von obiger Arbeit abgeleiteten Konsequenzen über die Formel der Olls. stehen also in guter Übereinstimmung mit den wahrscheinlichen Konsequenzen der aus dem Studium der Oxydationsvorgänge hervorgehenden Tatsachen. Andererseits denken wir aber auch, daß unsere Befunde mit der Annahme der Äthylenoxydbindung zur Wahrscheinlichkeit beitragen, mit der wir im primären Oxydationsprodukt der SH-Gruppe ein Peroxyd vermuten.

Schlußfolgerung.

Das aus der Linolensäure unter katalytischer Einwirkung der SH-Gruppe entstehende primäre Oxydationsprodukt ist kein Peroxyd, sondern ein Äthylenoxyd.

---

[1]) *H. Wieland*, Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. Erg. d. Physiol. **20**, 480, 1922.

[2]) *N. Prileschajew*, Chem. Centralbl. **1907**, II, 787; Ber. **42**, 4811, 1909; Chem. Centralbl. **1911**, I. 1279; ebendaselbst **1912**, II, 2090.

[3]) Nachdem die Reaktion auch in lipoiden Lösungsmitteln glatt abläuft, ist es auch verständlich, daß die SH-Oxydation der Lls., so wie *Meyerhof* findet, durch Narkotika nicht gehemmt wird.

Studien über die biologische Oxydation.

II. Mitteilung:

Über den Mechanismus und die Bedeutung der SH-Katalyse.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

In der vorhergehenden Mitteilung[1]) wurde gezeigt, daß das unter katalytischer Mitwirkung der SH-Gruppe entstehende Oxyd der Linolensäure ein Äthylenoxyd ist, und es wurde darauf hingewiesen, daß das Entstehen eines Äthylenoxyds an einer Doppelbindung mit großer Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit eines Peroxyds spricht. Würde dies tatsächlich zutreffen, so müßte man sich die SH-Katalyse für diesen Fall derart vorstellen, daß sich die SH-Gruppe zu einem sehr geringen Teile mit dem O=O der Luft zu einem Peroxyd verbindet. Der derart aktivierte Sauerstoff wird dann der zu oxydierenden Substanz abgegeben. Nachdem die als SH verwendete Thioglykolsäure bei saurer Reaktion an der Luft praktisch keinen Sauerstoff aufnimmt, muß man annehmen, daß stets nur ein sehr geringer Teil der Thioglykolsäure sich mit dem Sauerstoff zu Peroxyd verbindet, aber daß das entladene Peroxyd stets mit großer Schnelligkeit nachgebildet wird. Mit anderen Worten würde dies heißen, daß das Gleichgewicht zwischen der Thioglykolsäure und ihrer Peroxydform sehr stark gegen die Seite der ersteren verschoben ist und sich bei Entladung des Peroxyds sehr rasch wieder einstellt, so daß die Reaktion bei Zufügung eines oxydablen Körpers mit beträchtlicher Schnelligkeit nach der Seite der Oxydation ablaufen kann.

Mit der Annahme eines derartigen Vorganges sind aber weitgehende Konsequenzen verbunden. Einerseits beziehen sich diese Konsequenzen auf die speziellen Fragen der Oxydation verschiedener Substanzen im tierischen Organismus, nachdem wir doch aus den Arbeiten von *A. Heffter*, *F. Batelli* und *L. Stern*, besonders aber von *O. Meyerhof* und *F. G. Hopkins* wissen, daß der Sulfhydrylgruppe eine sehr weitgehende Bedeutung für die Zellatmung zukommt, wenn sie nicht gar im Mittelpunkte der ganzen Zellatmung steht.

---

[1]) Diese Zeitschr. 1924.

Andererseits bliebe auch die allgemeine Theorie der Zellatmung durch diese Frage nicht unberührt. Bekannterweise wurde in neuerer Zeit die Idee des aktiven Sauerstoffs von vielen Forschern ganz aufgegeben und mit der Idee des aktiven Wasserstoffs ersetzt, trotzdem die biologischen Oxydationen viele frappante Analogien mit der Peroxydoxydation aufweisen und Peroxydasen in der Zelle eine derart allgemeine Verbreitung haben, daß ihre Gegenwart von manchen Forschern als Kriterium des Lebens verwendet wird.

Bei der experimentellen Bearbeitung der Frage schien der erste nötige Schritt der zu sein, die Gegenwart eines intermediären Peroxyds an der SH-Gruppe mit direkten und sicheren Methoden nachzuweisen.

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dieser Frage, und Verfasser denkt, daß es ihm gelungen ist, diese mit befriedigender Sicherheit zu beantworten. Es sei hier also vorausgreifend das Resultat dieser Arbeit wiedergegeben, das sich dahin zusammenfassen läßt, daß *die SH-Gruppe den molekularen Sauerstoff primär als ein chemisch in hohem Maße aktives Peroxyd bindet.*

Experimenteller Teil.

Unser Plan war der, die Thioglykolsäure in Gegenwart von pflanzlicher Peroxydase mit einer Reihe der bekannten Peroxydreagenzien (Hydrochinon, Pyrogallol, Benzidin, Leukofarbstoffe usw.) zusammenzubringen, um aus dem entstehenden gefärbten Oxydationsprodukt auf das Bestehen oder Nichtbestehen des Peroxyds schließen zu können. Es wurde also nach dem Vorgange von *A. Bach*[1]) aus Meerrettichwurzeln eine sehr aktive Peroxydase präpariert. Weiterhin wurde nach *Baeyer* und *Villinger*[2]) Äthylperoxyd hergestellt, um hiermit ohne Störung durch Katalasen die optimalen Wasserstoffionenkonzentrationen der Peroxydasereaktion für die weiteren Versuche festzustellen. War dies bekannt, so schritten wir nun zur Untersuchung der Thioglykolsäure. Das Versuchsresultat war aber negativ, das System Thioglykolsäure + Peroxydase + Peroxydreagens gab keine gefärbten Oxydationsprodukte.

Eine eingehendere Analyse zeigte aber, daß diesem negativen Resultat keine Beweiskraft zugeschrieben werden kann. Den allgemeinen Erfahrungen entsprechend, konnten wir uns nämlich überzeugen, daß der durch pflanzliche Peroxydase übertragene Sauerstoff nur labilen Wasserstoff wegzuoxydieren vermag, um den es sich auch in den genannten Peroxydasereaktionen handelt. Es liegt aber im Wesen der Sache, daß der wegoxydierte Wasserstoff auch mit großer Leichtig-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 3785, 1904.
[2]) *S. A. Bach* und *R. Chodat*, ebendaselbst 36, 1756, 1903.

keit wieder angenommen wird, wenn man das Oxydationsprodukt mit einem genügend wirksamen Reduktionsmittel behandelt. Bekannterweise ist aber die Thioglykolsäure selbst ein derartiges starkes Reduktionsmittel, das, wie wir uns überzeugen konnten, die gefärbten Oxydationsprodukte der oben genannten Peroxydreagenzien mit Leichtigkeit wieder zu ihren ungefärbten Verbindungen zu reduzieren vermag. Es mußte also eine Oxydation in Gegenwart eines starken Reduktionsmittels nachgewiesen werden.

Es war also deutlich, daß uns keine der oben genannten Reagenzien auf unsere Frage eine Antwort geben konnte, sondern daß hier zum Nachweis des Peroxyds eine irreversible Reaktion herangezogen werden mußte. Zu diesem Ende schien uns die von *F. Batelli* und *L. Stern*[1]) beschriebene Oxydation der Ameisensäure zu Kohlensäure und Wasser geeignet, die eine praktisch irreversible Reaktion darstellt, so daß die Reaktion nicht durch eine sekundäre Reduktion gestört werden konnte. Bei dieser Reaktion war aber unser Katalysator, die pflanzliche Peroxydase, unbrauchbar, da diese den Sauerstoff nicht in genügend aktiver Form überträgt, um diese Säure wegoxydieren zu können, eine Beobachtung, in der wir *Batelli* und *Stern* bestätigen können.

Es mußte also ein Sauerstoffüberträger gesucht werden, der den Sauerstoff in aktiverer Form überträgt, als dies bei den pflanzlichen Peroxydasen der Fall ist.

Als solche waren uns zwei Katalysatoren bekannt, die tierische Peroxydase, über die wir noch keine persönliche Erfahrung besaßen, und das Eisen. Die katalytische Wirkung des letzteren ist aus der Literatur seit lange her bekannt und war uns auch geläufig. Aus technischen Gründen entschlossen wir uns also zum Gebrauch des letzteren.

Unsere Versuchsanordnung gestaltete sich also derart, daß wir die zu untersuchenden Flüssigkeitsmischungen in eine Mikrowaschflasche brachten, diese im Wasserbade auf 37° C erwärmten und durch die Waschflasche einen ruhigen Strom kohlensäurefreier Luft saugten. Hinter diese erste Waschflasche mit der zu untersuchenden Substanzmischung wurde eine zweite geschaltet, die mit Barytwasser beschickt wurde. In dieser wurde also die etwa produzierte Kohlensäure als Bariumcarbonat aufgefangen und als solche erkannt. Die Menge des derart gebildeten Carbonats wurde nicht quantitativ bestimmt, da wir keine zahlenmäßigen Angaben nötig hatten. Wir bezeichnen in den folgenden Protokollen eine mäßige Trübung des Barytwassers mit +, eine starke Trübung mit +++. Die Versuche dauerten stets ungefähr 10 Minuten lang.

Die verwendeten Lösungen waren die folgenden:

---

[1]) Diese Zeitschr. **13**, 44, 1908.

1. *Äthylperoxyd* ist auf aktiven Sauerstoff berechnet 1,0 n. In allen Versuchen wurde 1 ccm dieser Lösung gebraucht.

2. *Ameisensäure*, normal. In allen Versuchen wurde 1 ccm gebraucht.

3. *Wässerige Lösung des Mohrschen Salzes.* Die Lösung enthielt ursprünglich 1 mg Fe per Kubikzentimeter, wurde aber durch Sedimentbildung schwächer. In allen Versuchen wurde zur entsprechenden Mischung 0,2 ccm dieser Lösung zugefügt.

4. Wässerige Lösung von *Thioglykolsäure* (*Kahlbaum*). Stärke (acidimetrisch) normal. In allen Versuchen wird 0,5 ccm dieser Lösung gebraucht.

Zunächst wurde die Oxydation der Ameisensäure mit Äthylperoxyd untersucht. Es zeigte sich hierbei, daß die freie Ameisensäure durch das Peroxyd allein nicht angegriffen wird, von diesem hingegen in Gegenwart eines Sauerstoffüberträgers (Fe) ziemlich energisch zu CO_2 oxydiert wird. Hiernach wurde die Thioglykolsäure geprüft, wobei Thioglykolsäure mit Ameisensäure gemengt wurde. Hierbei zeigte sich ein dem Äthylperoxyd ganz analoges Verhalten: Thioglykolsäure plus Ameisensäure gibt kein CO_2, Thioglykolsäure plus Ameisensäure plus Fe gibt eine ziemlich energische, wenn natürlich auch etwas schwächere CO_2-Produktion. Wiederholte Versuche geben dasselbe Resultat, das mit den entsprechenden Kontrollversuchen in die Tabelle I eingetragen ist.

Tabelle I.

Nr.	Mischung	CO_2-Produktion ohne Fe	CO_2-Produktion mit Fe
1	Äthylperoxyd	0	0
2	Ameisensäure	0	0
3	Thioglykolsäure	0	0
4	Äthylperoxyd, Ameisensäure	0	+++
5	Thioglykolsäure, Ameisensäure . . .	0	++

Hiermit war also die Gegenwart eines Peroxyds an der Thioglykolsäure festgestellt. Immerhin schien es aber wünschenswert, weitere Analogien auch bei Anwendung anderer Substanzen zu erhalten. Es wurde also nach weiteren Reaktionen des Äthylperoxyds gesucht. Hierbei zeigte sich, daß durch das Äthylperoxyd bei Gegenwart von Fe in analoger Weise die folgenden Substanzen zu CO_2 oxydiert werden: Essigsäure, Propionsäure, Valeriansäure, Milchsäure, hingegen unoxydiert bleiben: Buttersäure und Glucose (letztere wurde durch einen Tropfen 0,15 mol. Phosphorsäure sauer gemacht). Die Prüfung der Thioglykolsäure ergab ein dem Äthylperoxyd vollkommen analoges Verhalten. In allen Versuchen, in denen an Stelle des Äthylperoxyds Thioglykolsäure verwendet wurde, wurde dieselbe analoge, wenn natürlicherweise auch etwas schwächere CO_2-Entwicklung erhalten. Ohne Fe war auch die Thioglykolsäure in allen Fällen unwirksam. Die von Äthylperoxyd unangegriffenen Substanzen blieben auch

bei der Thioglykolsäure unangegriffen. Eisen selbst, ohne Thioglykolsäure, gab mit keinem der genannten Substanzen eine CO_2-Entwicklung (in der Tabelle sind diese Kontrollversuche weggelassen). Alle Säuren wurden als normale Lösungen (in demselben Verhältnis wie bei der Ameisensäure) verwendet. Von Glucose wurde eine 10proz. Lösung gebraucht. Die Einwirkung der Peroxyde auf Glucose wurde auch im Polarimeter kontrolliert, wobei keine Drehungsveränderung gefunden wurde. Im Barcroftmanometer gab Glucose mit der Thioglykolsäure auch keinen Sauerstoffverbrauch, so daß wir annehmen können, daß die Glucose durch die Peroxyde vollkommen unbeeinflußt blieb.

Tabelle II.

Nr.	Mischung	CO_2-Produktion ohne Fe	CO_2-Produktion mit Fe
1a	Essigsäure, Äthylperoxyd	O	+++
1b	Essigsäure, Thioglykolsäure	O	++
2a	Propionsäure, Äthylperoxyd	O	+++
2b	Propionsäure, Thioglykolsäure	O	++
3a	Buttersäure n, Äthylperoxyd	O	O
3b	Buttersäure n, Thioglykolsäure	O	O
4a	Milchsäure, Äthylperoxyd	O	+++
4b	Milchsäure, Thioglykolsäure	O	++
5a	Glucose, Äthylperoxyd	O	O
5b	Glucose, Thioglykolsäure	O	O

Aus dieser Tabelle erhellt zweifellos, daß wir es hier mit einem Peroxyd zu tun haben, und daß sich die Thioglykolsäure also mit dem Sauerstoff der Luft zu einem Peroxyd verbindet, das bei Gegenwart eines geeigneten Sauerstoffüberträgers zur Entfaltung starker oxydativer Wirkungen befähigt ist.

Zusammenfassung.

Die Thioglykolsäure verbindet sich mit dem molekularen Sauerstoff der Luft zu einem sehr aktiven Peroxyd und ist in dieser Weise befähigt, mit oder auch ohne Gegenwart geeigneter Katalysatoren für die Zellatmung wichtiger Substanzen zu Kohlensäure zu oxydieren, und somit die Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und der sonst stabilen zu verbrennenden Substanz zu vermitteln.

Kritisches und Experimentelles über die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen. II.

Von

Otto Fürth.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 2. Februar 1924.)

I. Die Diazoreaktion des Tyrosins.

(Versuche von **Walter Fleischmann** und **Josef Güdemann.**)

1. Unter den Bruchstücken des Eiweißmoleküls sind, soweit bisher bekannt, nur das *Histidin* und das *Tyrosin* befähigt, beim Diazotierungsversuch gefärbte Verbindungen zu liefern. Es erschien also der Versuch immerhin berechtigt, nach Beseitigung des Histidins aus den Eiweißhydrolysaten durch Phosphorwolframsäure den Tyrosingehalt im Filtrat mit Hilfe der Diazoreaktion kolorimetrisch abzuschätzen. Über einige Versuche, dies mit Hilfe des seinerzeit von *M. Weiss* und *N. Ssobolew*[1]) in diesem Laboratorium für Zwecke der Histidinbestimmung ausgearbeiteten Vorganges zu tun, ist schon bei früherer Gelegenheit berichtet und dem Bedürfnis Ausdruck gegeben worden, diesen Schätzungsvorgang, wenn möglich, durch ein exakteres Bestimmungsverfahren zu ersetzen[2]).

Es schien uns nun zunächst eine Orientierung über die *Mengenverhältnisse, in denen Tyrosin und Diazoreagens zueinander in Beziehung treten*, erwünscht. Zu diesem Zwecke wurde ein Vorgang eingeschlagen, ganz analog dem Vorgange, den *Lautenschläger*[3]) in *Kossels* Laboratorium zur Titration des Histidins mit Diazobenzolsulfosäure eingeschlagen hatte: Eine Diazolösung wurde unter Kühlung einer sodalkalischen Lösung zugesetzt: „Von Zeit zu Zeit wird ein Tropfen der Titrierflüssigkeit auf einem Tüpfelteller mit einer alkalischen Lösung von technischem K-Salz (1, 8, 4, 6-amidonaphtholdisulfosaures

---

[1]) *M. Weiss* und *N. Ssobolew*, diese Zeitschr. **58**, 119, 1913.
[2]) *O. Fürth* und *W. Fleischmann*, ebendaselbst **127**, 137, 1922.
[3]) *C. L. Lautenschläger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 232, 1918.

Natrium) oder H-Salz (1, 8, 3, 6-amidonaphtholdisulfosaures Natrium) zusammengebracht. Ist alles Histidin in Diazofarbstoff übergeführt, so befindet sich in der Titrierflüssigkeit freie Diazolösung, welche schon in geringer Menge mit den oben genannten Indikatoren eine tief violette Farbe gibt."

a) Wir gingen nun derart vor, daß wir zu 20 ccm einer 0,5 proz. Tyrosinlösung in überschüssigem Na_2CO_3 (enthaltend 0,1 g Tyrosin) in einem weithalsigen Kölbchen n/16 Diazolösung zufließen ließen. (Dieselbe aus je 10 ccm n/4 Sulfanilsäure in verdünntem HCl und n/4 $NaNO_2$-Lösung frisch bereitet und mit 20 ccm H_2O verdünnt, enthält 1,30 proz. Sulfanilsäure.) Nach jedem Zusatze der Diazolösung wurde sogleich und nach Ablauf von 2 Minuten ein Tropfen auf Fließpapier mit sodalkalischer H-Salzlösung geprüft. Nach Zusatz von 17 ccm des Diazoreagens war die erste, schnell verschwindende Violettfärbung bemerkbar. Jedoch selbst nach Zusatz von 23 ccm des Diazoreagens verschwand die Reaktion noch, wenn man die Prüfung gegen H-Salz erst nach Ablauf einiger Minuten vornahm.

Es war die erste Spur eines vorübergehenden Diazoüberschusses nachweisbar, wenn auf 0,1 g Tyrosin 17 ccm n/16 Sulfanilsäure (= 0,221 g Sulfanilsäure) zugesetzt worden war, d. h. auf *1 Mol. Tyrosin 1,9 Mol. Diazobenzolsulfosäure.*

b) Eine Wiederholung des Versuchs, mit der Abweichung jedoch, daß die H-Salztüpfelprobe erst nach einer Wartezeit von 20 Sekunden vorgenommen wurde, ergab als Titrationsgrenze einen Zusatz von 20 ccm der Diazolösung entsprechend einer Relation *1 Mol. Tyrosin : 2,2 Mol.* Diazobenzolsulfosäure.

c) Ein weiterer Versuch wurde in der Art ausgeführt, daß die Tüpfelprobe direkt auf ein durch Tränkung mit H-Salzlösung berechnetes Reagenzpapier nach kurzem Schütteln vorgenommen wurde. Beginn der Reaktion nach Zusatz von 17½ ccm der Diazolösung. Jedoch erst nach Zusatz von 24 ccm war ein Überschuß zu bemerken, der noch nach einer Viertelstunde nachweisbar war. Also auch hier ein unterer Grenzwert, etwa pro *1 Mol. Tyrosin : 2 Mol. Diazobenzolsulfosäure.*

d) Tüpfelung auf H-Salzpapier (hergestellt durch Tränkung von Filtrierpapier mit 0,05 proz. sodalkalischer H-Salzlösung und nachfolgender Trocknung). Bei portionsweisem Zusatz von n/16 Diazolösung zu einer Lösung von 0,1 g Tyrosin erfolgte die erste Andeutung eines fast momentan verschwundenen Überschusses der Diazolösung bereits nach Zusatz von etwa 8 ccm derselben.

Nach Zusatz von 16, 21, 23, 26 ccm n/16 Diazolösung war die Violettfärbung noch nach ½, 5, 10, 30 Minuten vorhanden.

e) Bei Anwendung einer doppelt so großen Tyrosinmenge (0,2 g) ergab sich wiederum ein Verbrauch von *2 bis 3 Mol. Diazobenzolsulfosäure.*

f) Wurde dagegen die in Reaktion gebrachte Tyrosinmenge nur halb so groß gewählt, so erschien der Verbrauch an Reagens merklich größer, nämlich *2½ bis 3½ Mol. Diazobenzolsulfosäure pro Molekül Tyrosin.*

Das ist nun selbstverständlich nicht etwa so zu verstehen, als ob wirklich 2 oder 3 Mol. Diazobenzolsulfosäure notwendigerweise in das Tyrosinmolekül eintreten müßten. *Hanke* und *Koessler*[1]) nehmen an,

[1]) *M. T. Hanke* und *K. K. Koessler*, Journ. of biol. Chem. **50**, 238, 1922.

daß sich die Reaktion zwischen Tyrosin und Diazobenzolsulfosäure einfach nach dem Schema abspiele:

$$\text{HO}-C_6H_2(H)_2(H)-CH_2-CH(NH_2)-COOH + \text{HO}-N=N-C_6H_4-SO_2.ONa$$

$$\rightarrow \text{HO}-C_6H_3(-N=N-C_6H_4-SO_2.ONa)-CH_2-CH.NH_2-COOH \rightleftarrows O=C_6H_3(=N-NH-C_6H_4.SO_2ONa)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

Es ist ja sicherlich sehr wohl möglich und wahrscheinlich, daß ein Teil der in Aktion tretenden Diazobenzolsulfosäure in *Nebenreaktionen* verbraucht werde. Sei dem nun wie immer: Eines ist wohl zu ersehen, daß der Versuch einer einfachen titrimetrischen Bestimmung des Tyrosins auf diesem Wege sicherlich keine Chancen bietet und wenig einladend erscheint.

2. Eine weitere Serie von Versuchen wurde nun, um festzustellen, unter welchen Bedingungen das Tyrosin eine *maximale Färbungsintensität* bei der Diazoreaktion gibt, in folgender Weise ausgeführt:

Das Diazoreagens wurde (vgl. *Weiss* und *Ssobolew*, l. c., S. 120) in folgender Weise bereitet: A. Sulfanilsäure 4 g, gelöst in 40 ccm reiner konzentrierter HCl (zur Lösung in der Kälte sind etwa 24 Stunden erforderlich), dann auf 400 ccm mit H_2O aufgefüllt. B. ½proz. Natriumnitritlösung. Unmittelbar vor dem Versuche wurden je 1 ccm von A. und je 2 ccm von B. gemischt, derart, daß 3 ccm der Mischung 0,01 g Sulfanilsäure entsprachen. Nunmehr wurden 0,01 g bzw. 0,05 g, bzw. 0,001 g Tyrosin mit Hilfe von ein wenig HCl in 10 ccm Wasser gelöst, dazu 3 bis 10 ccm Diazoreagens, mit Na_2CO_3 alkalisch gemacht, in einem Meßkölbchen auf 20 ccm mit H_2O aufgefüllt. Die Intensität der so erhaltenen Färbungen wurde nun mit Hilfe des Dubosqkolorimeters miteinander verglichen.

Es ergibt sich als Resultat, *daß die Intensität der Farbenreaktion mit Zunahme der relativen Menge an Sulfanilsäure stetig zunimmt und erst dann ihr Maximum erreicht, wenn auf je 1 Gewichtsteil Tyrosin je 7 Gewichtsteile Sulfanilsäure in Aktion gelangt sind. Es entspricht dies einer Relation von etwa 1 Mol. Tyrosin : 6 Mol. Diazobenzolsulfosäure.* Dann bleibt die Reaktion bei weiterer Zunahme der Sulfanilsäure eine Zeitlang stationär, um dann weiter stark abzusinken.

Es entspricht diese Erfahrung dem Postulate des *Vorganges* von *Weiss* und *Ssobolew*, einerseits rein empirisch jene Menge Diazoreagens zu ermitteln, welche zur Erzielung einer maximalen Farbenreaktion notwendig ist,

andererseits aber einen allzu großen Überschuß des Reagens als schädlich zu vermeiden.

Versuch, ausgeführt mit Tyrosin g	Diazoreagens in 20 ccm ges. Flüssigkeit ccm	Entsprechend Sulfanilsäure g	Relative Intensität der Färbung	Auf 1 g Tyrosin gelangte zur Anwendung Sulfanilsäure g	Menge an Sulfanilsäure
0,01	3	0,010	1,0	1,0	1 bis 3,3 fache
	4	0,013	1,2	1,3	
	5	0,017	1,7	1,7	
	6	0,020	2,0	2,0	
	7	0,023	2,0	2,3	
	8	0,027	2,3	2,7	
	9	0,030	2,7	3,0	
	10	0,033	3,0	3,3	
0,005	3	0,010	1,0	2,0	2 bis 9,9 fache
	5	0,017	1,6	3,4	
	7	0,023	2,0	4,6	
	9	0,030	2,0	6,0	
	11	0,036	2,6	7,2	
	13	0,043	2,5	8,6	
	15	0,049	2,7	9,9	
0,001	3	0,010	1,0	10,0	10 bis 33 fache
	4	0,013	0,8	13,0	
	5	0,017	0,8	17,0	
	6	0,020	0,6	20,0	
	7	0,023	0,6	23,0	
	8	0,027	0,6	27,0	
	9	0,030	0,6	30,0	
	10	0,033	0,4	33,0	

So werden beim Ansatze der Standardlösung nach diesem Verfahren 10 ccm einer 0,01 proz. Tyrosinlösung (= 0,0010 g Tyrosin) versetzt mit 3 ccm Reagens, bestehend aus 1 Teil Sulfanilsäurelösung und 2 Teilen 0,5 proz. $NaNO_2$. Die erstere enthält 4 g Sulfanilsäure in 400 ccm verdünnter HCl. Unter diesen Bedingungen kommen auf 1 Gewichtsteil Tyrosin 10 Gewichtsteile Sulfanilsäure in Aktion.

Auch bei dem im nächsten Abschnitt zu erörternden *mikrokolorimetrischen Verfahren von Hanke und Koessler* trat, wie eine Umrechnung der in diesen Publikationen gegebenen Versuchsdaten[1]) lehrt, ein sehr erheblicher Überschuß an Sulfanilsäure (mindestens das Zehnfache der angewandten Tyrosinmenge, in der Regel aber ein Vielfaches davon) in Aktion.

3. Die im Jahre 1919 erfolgte Publikation eines mit großer Sorgfalt ausgearbeiteten und sehr leistungsfähigen mikrochemischen *Histidinbestimmungsverfahren* auf Basis der Diazoreaktion durch *K. K. Koessler* und *M. T. Hanke*[2]) hat uns seinerzeit veranlaßt, die Anwendung dieses Vorganges in sinngemäßer Weise auf die Bestimmung des Tyrosins in Proteinhydrolysaten nach Beseitigung des Histidins durch Phosphorwolframsäure zu versuchen. Unsere (zu Beginn des Jahres 1922 aus-

[1]) Journ. of biol. Chem. **50**, 241, 243, 246 und 258.

[2]) *K. K. Koessler* und *M. T. Hanke*, ebendaselbst **89**, 497, 1919.

geführten) Versuche sind durch eine den gleichen Gegenstand behandelnde, uns aber damals noch unbekannt gebliebene neue Publikation von *Hanke* und *Milton*[1]) überholt worden. Eine kurze nachträgliche Erwähnung unserer einschlägigen Befunde, die wir unsererseits nicht fortgesetzt haben, dürfte jedoch in diesem Zusammenhange vielleicht am Platze erscheinen, insofern dieselben eine Bestätigung und Ergänzung der Resultate von *Hanke* und *Koessler* bilden.

Wir arbeiteten meist mit einer 0,01- oder 0,02proz. *Tyrosinlösung*, *Sulfanilsäure* kam in 0,9proz. salzsaurer Lösung, *Natriumnitrit* als 5proz. Lösung zur Verwendung, *Natriumcarbonat* in 1,1proz. bzw. 2,2proz. Lösung (ger. rein, *Merck*). Als Testlösung diente uns ein Gemenge: 20 ccm Methylorangelösung + 0,2 ccm Kongorotlösung auf 500 ccm Wasser. Die *Methylorange*lösung wurde durch Lösen von 0,2 g auf 200 ccm Wasser und achtfache Verdünnung mit Wasser gewonnen. Die *Kongorotlösung* wurde erhalten durch Lösen von 2,5 g Kongorot (*Grübler*, im Vakuum getrocknet) in 50 ccm 96proz. Alkohol und Auffüllen mit H_2O auf 500 ccm. Das *Reagens* wurde in der Regel so bereitet, daß je 3 ccm der Sulfanilsäure- und Natriumnitritlösung in ein 100-ccm-Meßkölbchen eingebracht und 5 Minuten unter der Wasserleitung gekühlt wurden; sodann wurden noch weitere 12 ccm der Natriumnitritlösung hinzugefügt, dauernd gekühlt, nach weiteren 5 Minuten auf 100 aufgefüllt.

Serienversuche wurden beispielsweise derart ausgeführt, daß je 1 ccm 0,006- bis 0,05proz. Tyrosinlösung mit 5 ccm 2,2proz. Na_2CO_3 und mit 4 ccm doppelt konzentrierter Diazoreagenzlösung in einem Troge des Dubosqkolorimeters angesetzt und mit einer ganz analog behandelten Tyrosinstandardlösung (0,02proz.) kolorimetrisch verglichen wurden.

Es ergab sich so statt:

0,050	Proz.	Tyrosin	ein	Wert	von	0,057	Proz.
0,040	,,	,,	,,	,,	,,	0,033	,,
0,030	,,	,,	,,	,,	,,	0,028	,,
0,020	,,	,,	,,	,,	,,	0,020	,,
0,018	,,	,,	,,	,,	,,	0,018	,,
0,016	,,	,,	,,	,,	,,	0,016	,,
0,014	,,	,,	,,	,,	,,	0,015	,,
0,012	,,	,,	,,	,,	,,	0,011	,,
0,010	,,	,,	,,	,,	,,	0,009	,,
0,008	,,	,,	,,	,,	,,	0,008	,,

Es sei hier ferner auf die vorzüglichen Resultate von *Hanke* und *Koessler* (l. c., S. 259) verwiesen. *Es unterliegt also keinem Zweifel, daß man die Konzentration reiner Tyrosinlösungen auf diesem Wege mit großer Genauigkeit ermitteln kann*[2]).

[1]) *M. T. Hanke* and *K. K. Koessler*, Studies on proteinogenous XIV. A microchemical colorimetric method for estimation of tyrosme, tyramine and other phenol. Journ. of biol. Chem. **50**, Nr. 1, p. 237, 1. Jänner 1922. Ferner auch XV, ebendaselbst, S. 271.

[2]) Nach *G. Hunter* (Biochem. Journ. **16**, 640, 1920) kann nach der Methode von *Hanke* und *Koessler* auch Tyrosin neben Carnosin quantitativ bestimmt werden.

Wie verhält es sich aber mit der Anwendbarkeit einer derartigen Bestimmungsmethode auf *Eiweißhydrolysate*?

Um Weitschweifigkeiten zu vermeiden, möchte ich mich hier nur mit der kurzen Mitteilung unserer Hauptresultate begnügen.

Die Gegenwart von manchen Aminosäuren erwies sich in bezug auf die Farbenreaktion hemmend (vgl. auch die einschlägigen Angaben von *Lautenschläger*, l. c.).

Alanin (10- bis 100facher Überschuß) äußerte nur eine unbedeutende Hemmungswirkung, *Glykokoll* in zehnfachem Überschuß: Keine Hemmung, wohl aber bereits bei 20fachem Überschuß eine merkliche Hemmung. Ähnlich verhielt sich das *asparaginsaure Natron*, das in 50fachem Überschuß den Farbeneffekt auf die Hälfte herabzudrücken vermochte. Dagegen fanden wir das *Leucin* in 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100fachem Überschuß dem Tyrosin gegenüber bei unseren Versuchsbedingungen ohne deutliche Hemmungswirkung. Da wir meinten, die Hemmungswirkung könnte vielleicht mit einem Angriffe der salpetrigen Säure auf die NH_2-Gruppen der Aminosäuren einhergehen, hofften wir, unsere Resultate vielleicht durch *Formolzusatz* (Deckung der NH_2-Gruppen) verbessern zu können. Es war dies aber nicht der Fall. Auch die Summe der Eiweißbestandteile, wie sie in *Leimhydrolysaten* enthalten ist, erwies sich störend.

Zu ähnlichen Resultaten sind auch *Hanke* und *Koessler* gelangt. Sie fanden jedoch (l. c., S. 261) bereits Glykokoll im Überschuß 1 : 5 und Leucin im Überschuß 1 : 10 störend. „Attempts are now being made in this laboratory to modify this method, so that it will be applicable to the estimation of tyrosine in proteins."

Tyrosin zeigt, wie die genannten Autoren gefunden haben, bei Kuppelung mit dem Diazoreagens in alkalischer Lösung zunächst eine rötliche Färbung, die aber bald zu einem Gelb von unbeständiger Intensität wird. Die Intensität derartiger Färbungen erscheint nicht immer der Menge des Tyrosins wirklich proportional. Wird aber nun ein wenig *salzsaures Hydroxylamin* hinzugefügt, so entstehen intensiv blaurote Färbungen, deren Intensität angeblich dem Gehalte an Tyrosin direkt proportional sein soll.

Es wäre sicherlich höchst erfreulich, wenn es den Bemühungen der verdienstvollen amerikanischen Forscher gelingen würde, von hier aus die vorliegenden Schwierigkeiten zu überwinden. Vorderhand sind dieselben aber noch so groß, daß man zurzeit die kolorimetrische Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen auf Grund der Diazoreaktion kaum anders als ein ziemlich *rohes, unkontrollierbaren Störungen unterworfenes Schätzungsverfahren* bezeichnen kann[1]).

[1]) Kürzlich hat *H. Brunswick* den Vorschlag gemacht (Zeitschr. f. physiol. Chem. 127, 269, 1923), die Tyrosinkomponente durch *Nitrierung* auszuschalten. „Es ergibt sich die Möglichkeit, an Eiweißlösungen oder Hydrolysaten nach der Methode der Autoren (*Fürth-Fleischmann, Weiss* und *Ssobolew*) durch zwei aufeinanderfolgende Bestimmungen, von denen die zweite nach durchgeführter Xanthoproteinreaktion vorgenommen wird, gleichzeitig den Gehalt an Histidin und Tyrosin festzustellen."

II. Das Bromadditionsvermögen der Proteinhydrolysate.

(Versuche von **Josef Warkany.**)

Wie bei früherer Gelegenheit auseinandergesetzt worden ist (*Fürth* und *Fleischmann*, l. c., S. 144), würde, falls die Annahme zutrifft, daß das Proteinmolekül von brombindenden Bestandteilen nur das *Tyrosin*, *Tryptophan* und *Histidin* enthält, das *Cystin* und *Phenylalanin* jedoch nicht befähigt sind, Brom aufzunehmen [*Aders-Plimmer* und *E. C. Eaves*[1])], der Versuch gerechtfertigt erscheinen, nach erfolgter Säurehydrolyse und Fällung mit Phosphorwolframsäure in den wasserhellen, von Tryptophan und Histidin freien Filtraten das Tyrosin auf dem Wege der Bromaddition zu bestimmen.

Einige diesbezügliche Versuche ergaben gute Übereinstimmung mit den mit Hilfe anderer Methoden ermittelten Werten. Andere Proteine, wie das Keratin und Blutalbumin, ergeben grobe Diskrepanzen und, auf Grund des Bromadditionsvermögens berechnet, unwahrscheinlich hohe Werte.

Wir sind nun daran gegangen, durch weitere Versuche uns darüber Klarheit zu verschaffen, ob die Säurehydrolysate, außer dem Tyrosin, etwa noch andere unbekannte bromaddierende Bestandteile enthalten.

Wir haben uns neuerlich davon überzeugt, daß die *Gegenwart von Phosphorwolframsäure* in den Filtraten die Bromaddition als solche nicht stört.

Eingewogen: 0,050 g Tyrosin, direkte Titration ohne Beseitigung der Phosphorwolframsäure ergab 0,049 g Tyrosin.

Da wir befürchteten, daß nicht sowohl die Phosphorwolframsäurefällung als solche, als vielmehr die Beseitigung des Überschusses in der üblichen Weise mit Ätzbaryt mit nachfolgender CO_2-Behandlung *Verluste an Tyrosin* herbeiführen konnte, haben wir die Bromaddition teils mit, teils ohne Beseitigung des Phosphorwolframsäureüberschusses durchgeführt.

1. *Casein* nach *Hammarsten.*	Tyrosin in Proz.
Das Bromverfahren ohne Entfernung der PWS ergab	6,0 8,0
Andere Hydrolyse	7,0
Nach Beseitigung des PWS-Überschusses mit Baryt-CO_2-Behandlung dagegen nur	5,5, 5,3
Frühere Bestimmungen für das Casein hatten ergeben:	
Emil Fischer, gravimetrisch	4,5
Fürth-Fleischmann, Bromaddition	4,7, 5,3
Fürth-Fleischmann, Diazokolorimetrie nach *Weiss-Ssobolew*	5,5
Fleischmann, Diazokolorimetrie nach *Koessler* und *Hanke*	5,2
M. Weiss, Millonverfahren	4,5
Folin-Looney, Kolorimetrisch nach Säurehydrolyse . .	5,4
Folin-Looney, Kolorimetrisch nach Barythydrolyse . .	5,3

[1]) *R. A. Plimmer* and *E. C. Eaves*, Biochem. Journ. 7, 297, 1913.

Die Übereinstimmung ist eine so gute, daß die Wahrscheinlichkeitsannahme berechtigt erscheint, daß die richtigen Werte zwischen 4½ bis 6½ Proz. liegen dürften und daß die Werte des direkten Bromadditionsverfahrens mit 7 bis 8 Proz. entschieden zu hoch sein dürften.

2. *Fibrin* aus Rinderblut. Tyrosin in Proz.

Achtstündige Hydrolyse mit konzentrierter HCl und Beseitigung des PWS-Überschusses mit Baryt . . 6,5, 6,3

Frühere Bestimmungen hatten ergeben:

Levene und *van Slyke*, gravimetrisch 3,3
Fürth-Fleischmann, Bromaddition 4,0, 4,7
Folin-Looney, kolorimetrisch, Säurehydrolyse 6,4
Folin-Looney, kolorimetrisch, Barythydrolyse 6,5
Fürth und *Dische* (noch unveröffentlichte Versuche):
Wittepepton (i. e. pepsinverdautes Fibrin) nach *Folin-Looney*, Barythydrolyse 5,3
Fibrin, ebenso 5,2
Fibrin, ebenso im Filtrate der Hopkinfällung des Tryptophans nach Beseitigung des Hg und HS: direkte Kolorimetrie nach *Folin* 6,4
Fibrin, Bromtitration nach Fällung mit PWS 4,7
Fibrin, ebenso, jedoch nach Beseitigung des PWS-Überschusses mit Baryt 4,4

3. *Lactalbumin*[1]).

Bromaddition ohne PWS-Fällung 8,8
Nach vorausgegangener PWS-Fällung 7,7
Bestimmung nach *Folin-Looney* nach vorausgegangener PWS-Fällung, Beseitigung des PWS-Überschusses mit Baryt und CO_2-Behandlung 4,8

Frühere Bestimmungen haben ergeben:

Folin und *Denis*[2]) 4,9
P. Thomas[3]), Millonverfahren 6,2

Hier sind die Werte, die das Bromverfahren liefert, so exorbitant, daß es schwer fällt, sie für richtig zu halten.

4. *Keratin aus Hornspänen.*

a) Bromverfahren nach Säurehydrolyse und Beseitigung der PWS mit Baryt 10,0
b) Bromverfahren nach Barythydrolyse, Fällung des Tryptophans mit *Hopkin*schem Reagens und Beseitigung des Hg mit H_2S 8,6

Dagegen das Hydrolysat a) nach *Folin-Looney* weiter verarbeitet nur 4,8

Frühere Bestimmungen hatten ergeben:

Fürth-Fleischmann, Bromverfahren 7,1, 10,2
Folin-Looney, Wolle-Säurehydrolyse 5,7
Folin-Looney, Wolle-Barythydrolyse 5,5

---

[1]) Albulactin von A. Wülfing, Berlin SW. 48.
[2]) *O. Folin* und *W. Denis*, Journ. of biol. Chem. **12**, 246, 1912.
[3]) *P. Thomas*, Bull. de la Soc. de Chem. Biol. **8**, 18. 1921.

Sammartino[1]) nach *Folin-Looney*: Tyrosin in Proz.

In menschlichen Haaren 3,6
In Hühneraugen 4,0
In menschlichen Nägeln 3,6

Gravimetrische Bestimmungen früherer Autoren . . 3,6, 4,6

5. *Keratin aus Federn.*

Bromverfahren nach Beseitigung der PWS
mit Baryt a) 9,8, 9,6
b) 7,2

Dagegen ergab die direkte Bestimmung nach *Folin-Looney* in drei Versuchen übereinstimmend nur 4,5, 4,5, 4,5

Hier klafft also ein zwischen den niederen Werten, die immer nach *Folin-Looney* und bei den gravimetrischen Bestimmungen sich ergeben haben (3½ bis 4½ Proz.) und den immer wiederkehrenden hohen Zahlen (7 bis 10 Proz.) der Bromversuche ein bisher unüberbrückter Abgrund.

6. *Carcinomeiweiß.*

Bromverfahren ohne Beseitigung der PWS-Säurehydrolyse 6,2, 5,3, 6,0

Dasselbe Hydrolysat nach Beseitigung der PWS durch Baryt und CO_2-Behandlung nach *Folin-Denis* kolorimetrisch. 4,9

Überblicken wir nunmehr das uns vorliegende Zahlenmaterial, so werden wir berechtigte Zweifel nicht unterdrücken können, wie sie bereits auch in den früheren einschlägigen Publikationen geäußert worden sind, ob nicht das Bromadditionsverfahren, so ansprechend dasselbe wegen der Sauberkeit des Vorganges sein mag und trotzdem die große Schärfe der Ablesungen in den wasserhellen Filtraten grobe Analysenfehler kaum möglich erscheinen läßt, uns doch irreführen kann. Es ist sicherlich für viele physiologische Zwecke sehr brauchbar und gibt z. B. beim Seidenfibroin (vgl. *Fürth-Fleischmann*, S. 148) sichere und ausreichend beglaubigte Werte. Wir können aber nicht die Möglichkeit ausschließen, daß unter den Produkten der Säurehydrolyse noch brombindende Produkte unbekannter Art sich finden könnten. Dieselben brauchten ja nicht einmal im Proteinmolekül vorgebildet sein; sie könnten etwa auch beim Zerfall anderer Komplexe (z. B. des Tryptophans oder Cystins) entstehen und würden dann eben dort fehlen, wo, wie z. B. bei Seidenfibroin, derartige Komplexe fehlen. *Solange es nun nicht gelungen ist, derartige Bedenken zu beseitigen, können wir auch das Bromadditionsverfahren, das sich jedenfalls als Mittel zur Charakterisierung von Proteinen nützlich erweisen dürfte, nicht als eigentliche Tyrosinbestimmungsmethode, vielmehr nur als ein Orientierungsmittel gelten lassen.*

---

[1]) *U. Sammartino*, diese Zeitschr. **133**, 485, 1922.

III. Kolorimetrisches Verfahren nach Folin-Looney.

(Versuche von **Josef Warkany**.)

Aus der Mitteilung von *O. Folin* und *M. Looney*[1]) geht hervor, daß es ihnen gelungen sei, mit Hilfe eines neuen, auf der Farbenreaktion des Tryptophans mit Phosphormolybdänsäure basierenden Verfahrens Tyrosin neben Tryptophan in *reinen* Lösungen dieser Substanzen mit sehr großer Genauigkeit zu bestimmen. Die genannten Autoren haben nun diesen Vorgang auch auf Proteinhydrolysate übertragen und so den Tyrosingehalt für eine Anzahl von Proteinen zu ermitteln versucht. Ihre Resultate sind in der Übersichtstabelle am Schluß dieser Abhandlung wiedergegeben.

Wir hatten auf diese Methode große Hoffnungen gesetzt, insbesondere auf Grund der in Tabelle I der zitierten Arbeit (p. 427: Table I, illustrating estimations of Tyrosine and Tryptophane in mictures) wiedergegebenen Resultate, die sich aber für Proteinhydrolysate leider nicht erfüllt haben, trotzdem wir uns bemüht haben, die Vorschriften der Autoren in genauester Weise zu befolgen.

Ein Beispiel möge unseren Vorgang veranschaulichen:

Casein-Barythydrolyse.

2 g *Hammarsten*schen Caseins wurden in einem Rundkolben mit 7 g kristallisierten Ätzbaryts und 50 ccm destillierten Wassers unter Rückflußkühlung 47 Stunden lang hydrolysiert (vgl. *Folin-Looney*, l. c., S. 430). Sodann wurden 60 ccm 20proz. H_2SO_4 hinzugefügt und die Flüssigkeit zur Vertreibung von H_2S eine Stunde am Wasserbade erhitzt. Sodann wurde auf 200 ccm aufgefüllt und die (einem 1proz. Caseinhydrolysate entsprechende) Flüssigkeit durch ein trockenes Filter filtriert (Filtrat X).

Die Originalvorschrift lautet nun weiter: „*Transfer from 1 to 8 ccm to a centrifuge tube* graduated at 10 ccm. Add 2 ccm of a solution containing 10% of mercuric sulfate and 5% of sulfuric acid (*Hopkins and Cole reagent*). Dilute with 5% sulfuric acid to the 10 ccm-mark. Insert a rubber stopper and give a few vigorous shakes. Let stand for 2 hours and then centrifuge. The supernatant solution containing the tyrosine is decanted from the sediment, which contains the tryptophane and these two fractions are then assayed colorimetrically as already described for pure mixtures of tryptophane and tyrosine.“

Wir haben nun von dem Filtrate X vier verschiedene Proben angesetzt:

a) 1 ccm Filtrat + 2 ccm Hopkinsreagens + 7 ccm 5proz. H_2SO_4,
b) 2 „ „ + 2 „ „ + 6 „ „ „
c) 3 „ „ + 2 „ „ + 5 „ „ „
d) 5 „ „ + 2 „ „ + 3 „ „ „

---

[1]) *O. Folin* and *J. M. Looney*, Colorimetric methods for the separate determination of Tyrosine, Tryptophane and Cystine in Proteins. Journ. of biol. Chem. 51, 421—434, 1922.

Weiter gingen wir unter wörtlicher Befolgung der Originalvorschrift (*Folin-Looney*, l. c., S. 425) vor, welche wie folgt lautet:

„Transfer 5 ccm (one-half) of the tyrosine containing liquid to 100 ccm volumetric flask and into another similar flask introduce 1 ccm of the standard tyrosine solution containing 1 mg of tyrosine. To the latter add also 1 ccm of the acid mercuricsulfate solution and 3 ccm of 5% sulfuric acid. Then add to each flask about 30 ccm of water, 20 ccm of saturated sodium carbonate solution and 4 ccm of 5% sodium cyanide solution in the order named. It is best to shake for a moment after the addition of the carbonate, before adding the cyanide. The yellow mercuric carbonate thrown down by the sodium carbonate promptly dissolves on adding the cyanide and shaking. Add 2 ccm of the *Phenolreagent*[1]), mix, let stand for 10 or better for 30 minutes and make the color comparison in the usual manner, setting the standard at 20 mm."

Indem wir nun die Standardtyrosinlösung im Dubosqkolorimeter auf eine Schichtendicke von 20 mm einstellten, ergaben sich für unsere vier Proben (als Mittel von je sechs Ablesungen) die *Ablesungen* a) 24,1 mm, b) 19,3 mm, c) 15,6 mm, d) 14,6 mm.

Die *Berechnung* ergibt sich nun z. B. für Probe b) folgendermaßen: In 100 ccm der Tyrosinstandardlösung war 0,001 g Tyrosin enthalten. Hätte die Kolorimetrie für die Probe b) die Ablesung 20 mm ergeben, so wäre in dem ganzen Inhalte des Meßkolbens gleichfalls 0,001 g Tyrosin enthalten. Da aber die Ablesung 19,3 betrug ($x : 0{,}001 = 20 : 19{,}3$), beträgt die Menge 0,00104, also abgerundet wiederum 0,001 g Tyrosin. Da nun von den 2 ccm, mit denen die Probe b) angesetzt worden ist, nur die Hälfte (5 von 10 ccm) in den Meßkolben übertragen worden ist, entspricht diese Menge nur 1 ccm des Filtrates X, das ein 1 proz. Caseinhydrolysat darstellt. Demnach enthält 1 ccm des 1 proz. Caseinhydrolysates (= 0,01 hydrolysiertes Casein) 0,001 g Tyrosin, daher sich für das Casein ein *Tyrosingehalt von 10 Proz.* ergeben würde.

In analoger Weise würde sich aber für Probe:

a) ein	Tyrosingehalt	des	Caseins	von	16,4	Proz.
b) „	„	„	„	„	10,0	„
c) „	„	„	„	„	8,2	„
d) „	„	„	„	„	5,4	„

ergeben.

In ganz analoger Weise sind einige weitere Beispiele durchgeführt worden, wobei die Kolorimetrie mit wechselnden Mengen des Filtrates „X" vorgenommen wurde.

---

[1]) Das *Phenolreagens* haben wir unter genauer Befolgung der Vorschriften von *Folin* und *Looney* (l. c., S. 422) mit den reinsten uns zugänglichen Reagenzien (*Kahlbaum*) bereitet: 15 g *Molybdänoxyd* und 10 g *Natriumhydroxyd* werden in 200 ccm Wasser bis zum völligen Verschwinden jeder NH_3-Spur gekocht. Dann werden 100 g *Natriumwolframat*, 50 ccm 85 proz. *Phosphorsäure*, 100 ccm konzentrierter *Salzsäure* und so viel Wasser hinzufügt, daß das Volumen 800 ccm betrug. Die Lösung wird 10 Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht, sodann durch Zusatz von etwas *Brom* entfärbt. Der Bromüberschuß wird weggekocht, nach Abkühlen filtriert und auf 1 Liter aufgefüllt.

Keratinbarythydrolyse.

Vom Filtrate X, das ein 1 proz. Keratinhydrolysat darstellt, sind drei Proben angesetzt worden:

	Filtrat X		Hopkins Reagens	+	5 proz. H_2SO_4
a)	1 ccm	+	2 ccm		7 ccm
b)	2 ,,	+	2 ,,		6 ,,
c)	5 ,,	+	2 ,,		3 ,,

Die kolorimetrischen Ablesungen gegen Standard 20 mm betrugen für a) 18 mm, b) 15 mm, c) 10,5 mm, woraus sich für das Kreatin ein Tyrosingehalt von a) 22 Proz., b) 13 Proz., c) 7,6 Proz. berechnen würde.

Fibroin-Barythydrolyse.

Analog durchgeführt mit a) 2 ccm, b) 3 ccm, c) 5 ccm des Filtrates ergab Werte von a) 13 Proz., b) 10 Proz., c) 6,6 Proz. Tyrosin.

Es liegt auf der Hand, daß wir unter diesen Umständen eine Aufklärung über den wahren Tyrosingehalt unserer Proteinhydrolysate von dem *Verfahren von Folin* und *Looney* nicht erwarten konnten. Angesichts der Empfindlichkeit der Methode gegenüber vielen Faktoren erscheint es ja nicht ausgeschlossen, daß die Beachtung irgend eines uns unbekannt gebliebenen wichtigen Umstandes, der aus der Abhandlung der genannten Autoren nicht zu ersehen ist oder eine nicht feststellbare Verschiedenheit der zur Reagenzbereitung erforderlichen Materialien, denselben zu befriedigenderen Resultaten verholfen hat. *Wir* vermochten zum mindesten über die sich hier ergebenden Schwierigkeiten nicht hinwegzukommen.

Es sei jedoch darauf verwiesen, daß auch *Gortner* und *Holm*[1]) bei kritischer Nachprüfung des nahe verwandten Verfahrens von *Folin* und *Denis* gefunden haben, *daß die durch das Folinsche Phenolreagens entwickelte Färbungsintensität keineswegs eine lineare Funktion des reagierenden Materials* darstellt. In ihren Schlußfolgerungen heißt es: „There is considerable evidence that *tyrosine* and *tryptophane* are not the *only* protein constituents, which produce blue colours with the phenol reagent. The amount of colour which is developed in a solution *is not a linear function of the reactive material*, but the colour values fall off sharply as concentration increases, until only an insignificant fraction of the reactive material is indicated by a measurement of the colour values of the solution containing any considerable amount of the reactive substances. Because of the peculier form of the color curves in relation to concentration it becomes necessary for one to know the *approximative concentration* of the reactive material *in advance* of the colorimetric determination, so that the colors may be developed

[1]) *R. A. Gortner* and *G. E. Holm*, The colometric estimation of Tyrosine by the Method of *Folin* and *Denis*. Journ. of the Amer. Chem. Soc. **42**, 1678, 1920.

and read at such a concentration, that the maximum colour values will be developed."

Diesen *scharfen Abfall der erzielten Farbwerte mit zunehmender Konzentration* haben wir eben auch bei unseren Versuchen festgestellt, und es liegt auf der Hand, daß das Postulat, *schon im voraus* den aproximativen Tyrosingehalt der kolorimetrischen Lösungen zu kennen, dort praktisch völlig unerfüllbar ist, wo es sich ja eben darum handelt, den ganz unbekannten Tyrosingehalt von Proteinen erst zu ermitteln.

Da sich nun auch die Hoffnungen, die wir auf das Verfahren von *Folin* und *Looney* gesetzt hatten, für uns vorherhand wenigstens nicht verwirklicht hatten, verbleibt uns für weitere Versuche, uns über den Tyrosingehalt von Proteinen zu orientieren, noch ein prinzipiell verschiedener Weg: Die kolorimetrische Auswertung der *Millonschen Farbenreaktionen*, welche um so mehr Beachtung verdient, als dieser Reaktion immerhin eine gewisse Spezifität zukommt. Nach *P. Thomas* soll allerdings die Reaktion nicht allein Tyrosin bedeuten, sondern auch andere bei der Eiweißhydrolyse auftretende Substanzen. Insbesondere gibt auch *Oxytryptophan* die Millonsche Reaktion[1]). „Une méthode colorimétrique basée sur la réaction de *Hofmann-Millon* de la tyrosine ne permet pas davantage un dosage de cette substance, mais elle permet de déterminer un indice phénolique charactérisant chaque protéine. On peut appeler indice phénolique le chiffre, calculé en pour cent de tyrosine, qui représente l'ensemble des products d'hydrolyse de nature phénolique, qui correspondent au protéique étudié." Dem Verfahren von *M. Weiss*[2]), von dem neuerdings auch *G. Haas* und *W. Trautmann* Gebrauch gemacht haben[3]), haftet der große Nachteil an, daß sich die Millonproben beim Erwärmen sehr schnell trüben und einen roten Niederschlag absetzen. Man ist, um diese Erscheinung zu vermeiden, genötigt, außerordentlich verdünnte Tyrosinlösungen (Standard 0,002 Proz.) zu verwenden, welche vorsichtig zu beginnendem Sieden erwärmt und 5 Minuten stehengelassen, eine blaßrote Färbung, jedoch keine Trübung in Erscheinung treten lassen. Daß sich bei so gewaltigen Verdünnungen auch die Fehler gewaltig multiplizieren müssen, liegt auf der Hand.

Da erscheint mir denn ein wesentlicher Fortschritt darin gelegen zu sein, daß *Thomas* derartigen Niederschlagsbildungen ganz ausweicht, indem er die Reaktion statt schnell durch Erwärmen, im

---

[1]) Private Mitteilung von *E. Abderhalden* an *P. Thomas*.

[2]) *M. Weiss*, diese Zeitschr. 97, 170, 1919; vgl. *Fürth* und *Fleischmann*, l. c., S. 146.

[3]) *G. Haas* und *M. Trautmann* (Gießen), vgl. kolorimetrische Studien mit Hilfe der *Millon*schen Probe in der Modifikation von *Weiss*. Zeitschr. f. physiol. Chem. 127, 52, 1922.

Übersichtstabelle der von verschiedenen

	Kolorimetrisches Verfahren nach		Bromadditions-verfahren	Diazoverfahren	
	Folin u. *Denis*	*Folin* u. *Looney* Original-bestimmungen		*M. Weiss* und *Ssobolew*	*Hanke* und *Kössler*
Casein	6,5[1])	5,5—5,4	4,7—5,3*)	5,5	5,2[2])
	6,0[5])	—	5,3—8,0[4])	—	—
Lactalbumin	4,9	4,8[1])	7,7—8,8[1])	—	—
Fibrin	7,5—8,5*)	6,5	4,7*)	—	4,7[1])
	6,4	—	4,4—6,5[3])	—	—
	7,2[4])	—	—	—	—
Wittepepton	5,9	5,9	—	—	—
Blutalbumin	6,5[1])	—	5,0—6,0[1])	3,4—4,0[1])	4,5—4,8[1])
	4,8[2])	—	5,5—5,9[2])	—	—
Blutglobulin	—	6,7	5,7—7,5[2])	—	—
Hämoglobin	—	—	2,8—3,7[1])	—	4,7
Ovalbumin	5,0	4,2	—	—	—
	4,5[2])	—	—	—	—
Edestin	5,2*)	5,7	—	—	—
Gliadin	3,3	3,4—3,5	—	—	—
Glutenin	5,8	4,5—4,7	—	—	—
Zein	5,5	5,5—5,6	—	—	—
Legumin	4,5[1])	—	2,1*)	—	—
	4,6—6,0*)	—	—	—	—
	4,5[2])	—	—	—	—
Conglutin	5,0*)	—	4,7*)	—	—
	6,8[1])	—	—	—	—
Hefeprotein	—	—	—	—	—
Keratin aus Harn	6,3—7,9*)	5,3	7,1—10,2*)	6,0—6,2*)	5,0—6,2[1])
	—	4,8[2])	8,6—10,0[2])	—	—
Keratin a. Federn	—	4,5[2])	7,2—9,8[2])	—	5,0[1])
Keratin aus Wolle	6,0	5,5—5,7	—	—	—
Keratin aus menschl. Epidemoidalgebilden	—	3,6—4,0[1])	—	—	—
Gelatin	0*)	Spuren	0*)	—	—
Amyloid	—	—	7,9*)	7,6*)	—
Bence-Jones sches Protein	—	7,4	—	—	—
Seidenfibroin	11,0*)	—	11,0*)	10,0*)	—

Die mit *) bezeichneten Zahlen rühren von

Autoren erhaltenen Tyrosinwerte.

Millonverfahren		Gravimetrische Bestimmungen früherer Autoren	Literatur
M. Weiss	Index Phenolique n. *P. Thomas*		
3,5—4,5*)	8,5	4,5[3])	1) *Folin* und *Denis*, Journ. f. biol. Chem. **12**, 239, 249, 1912. — 2) *W. Fleischmann* (unveröffentlichte Beobachtungen). — 3) *E. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151, 1901. — 4) Eigene Versuche. — 5) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 152, 1922.
5,6	—	—	
—	6,2	—	1) *Warkany* (unveröffentlichte Beobachtungen).
4,0*)	7,6	3,3—3,8[2])	1) *W. Fleischmann* (unveröffentl. Beobacht.) — 2) *P. A. Levene* und *van Slyke*, diese Zeitschr. **18**, 440, 1908. — 3) *Warkany* (unveröffentl. Beobacht.). — 4) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
6,0[4])	—	—	
—	—	—	
—	—	3,3[2])	
3,5	—	2,0—2,5	1) *W. Fleischmann*, (unveröffentlichte Beobachtungen). — 2) *U. Kijotaki*, diese Zeitschr. **134**, 332, 1922. — 3) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
4,8—5,0[3])	—	—	
—	—	2,5[1])	1) *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. phisiol. Chem. **44**, 17, 1908. — 2) *U. Kijotaki*, diese Zeitschr. **134**, 333, 1922.
—	—	—	1) *U. Kijotaki*, diese Zeitschr. **134**, 331, 1922.
3,8[2])	—	1,8[1])	1) *T. B. Osborne*, *D. B. Jones* and *C. S. Leavemoorth*, Amer. Journ. f. Physiol. **24**, 252, 1909. — 2) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
—	—	—	
—	6,8	2,1[1])	1) *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 499, 1902/3.
—	4,8	2,4[1])	1) *E. Abderhalden* und *F. Samuely*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 276, 1905.
—	5,1	4,3[1])	1) *T. B. Osborne* and *S. H. Clapp*, Amer. Journ. f. Physiol. **17**, 231, 1906.
—	7,9	3,6[1])	1) *T. B. Osborne* and *S. H. Clapp*, Amer. Journ. f. Physiol. **20**, 407, 1907/8.
3,5*)	—	1,5—2,4	1) *Folin* und *Denis*, l. c. — 2) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
3,8[2])	—	—	
—	—	—	
3,7[1])	—	—	1) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
3,7[1])	—	—	
—	4,1—5,4	—	
7,7*)	—	4,6[2])	1) *W. Fleischmann* (unveröffentlichte Beobachtungen). — 2) *E. Fischer* und *T. Dörpinghaus*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 462, 1922. — 3) *Warkany* (unveröffentlichte Beobachtungen). — 4) *Haas* und *Trautmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 52, 1922.
6,5[4])	—	—	
—	—	—	1) *W. Fleischmann* (unveröffentl. Beobacht.). — 2) *Warkany* (unveröffentl. Beobacht.).
—	—	2,9[1])	1) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 349, 1907.
—	—	—	1) *U. Samartino*, diese Zeitschr. **133**, 405, 1922.
0*)	—	0	
—	—	—	
—	—	4,2[1])	1) *F. G. Hopkins* und *H. Savory*, Amer. Journ. f. Physiol. **18**, 189, 1911.
8,0*)	—	10,5	

O. Fürth und *W. Fleischmann* (l. c.) her.

Laufe einiger Stunden bei Zimmertemperatur sich abspielen läßt. Wenn sich auch das von *Thomas* angegebene Verfahren für uns als nicht ohne weiteres brauchbar erwiesen hat, so glauben wir doch auf Grund im Gange befindlicher Versuche zu der Hoffnung berechtigt zu sein, daß uns der angedeutete Weg schließlich doch zum Ziele führen dürfte.

Zusammenfassung.

Wir kommen also vorderhand zu dem Ergebnis, daß keine der erörterten Methoden, weder die *Diazoreaktion*, noch die *Bromaddition*, weder die Farbenreaktion mit *Phosphormolybdänsäure*, noch die *Millon*sche Reaktion und sicherlich auch nicht die *gravimetrische Bestimmung* uns ein wirklich zuverläßliches Mittel an die Hand gibt, um den Tyrosingehalt eines Proteins in einwandfreier Weise ermitteln zu können. Dieselben ermöglichen zwar eine gewisse Orientierung und in manchen Fällen auch eindeutige Resultate. So werden wir nicht daran zweifeln, daß die Gelatine frei von Tyrosin sei, das Seidenfibroin dagegen 10 bis 11 Proz. davon enthalte[1]). Für die Mehrzahl der Proteine sind wir aber von klaren und eindeutigen Resultaten noch weit entfernt (vgl. die Tabelle I). Der Gehalt reiner oder annähernd reiner Tyrosinlösungen kann freilich auf jedem dieser Wege in befriedigender Weise ermittelt werden.

So wenig erfreulich diese Erkenntnis auch sein mag, erscheint es doch geboten, uns dieselbe klarzumachen. Ist doch nichts dem Fortschritte der Wissenschaft so hinderlich als die irrige Meinung, eine Frage sei gelöst, die tatsächlich von ihrer Lösung noch weit entfernt ist.

---

[1]) Gravimetrische Bestimmung 10,5 Proz., *Folin-Denis* 11 Proz., Bromaddition 11 Proz., Diazobestimmung 10 Proz., vgl. *Fürth-Fleischmann*, l. c., S. 148.

Kritisches und Experimentelles über die Tryptophanbestimmung in Proteinen.

Von

Otto Fürth und Zacharias Dische.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 2. Februar 1924.)

I. Einleitung.

Vor einiger Zeit hat der eine von uns gemeinsam mit *E. Nobel*[1]) und *F. Lieben*[2]) ein Verfahren zur Bestimmung des Tryptophans angegeben. Dasselbe beruht auf der kolorimetrischen Anwendung der *Voisenet*schen Reaktion, das ist der schönen, rotvioletten Färbung, welche sowohl Lösungen von freiem Tryptophan, als auch tryptophanhaltige Proteine geben, wenn man dieselben unter bestimmten Bedingungen mit etwas Formaldehyd, einem großen Überschuß konzentrierter Salzsäure und mit einer geringen Menge einer stark verdünnten Nitritlösung behandelt. Die Methode ermöglicht, dank der relativen Resistenz des Tryptophans gegenüber Alkalieinwirkung, auch die direkte Bestimmung des Tryptophans in Proteinen ohne vorherige Abspaltung desselben. Wofern man es nicht vorzieht, die Aufschließung auf dem Wege der Verdauung zu bewerkstelligen, bringt man das Protein durch eine (nicht länger als nötig fortgesetzte) Einwirkung von 20- bis 30proz. Alkalilauge am Wasserbade in Lösung. Mit 2 ccm einer derartigen Lösung wird dann die Voisinetreaktion in typischer Weise angestellt.

Nach *Fritz Kretz*[3]) (Wiener pflanzenphysiologisches Institut) ist diese Farbenreaktion, der der Vorzug einer hochgradigen Spezifität zweifellos zukommt (nach Fixierung pflanzlicher Gewebe mit Formol und Sublimat und Einbettung in ein Kieselsäuregel) auch zum *mikrochemischen Nachweise* des Tryptophans in Zellbestandteilen sehr wohl verwendbar; die Färbung ist selbst in den kleinsten Zellinhaltskörpern noch erkennbar.

E. Komm und *E. Böhringer*[4]) haben kürzlich eine Modifikation dieser Reaktion in dem Sinne versucht, daß sie das Nitrit ganz wegließen, dafür

---

[1]) *O. Fürth* und *E. Nobel*, diese Zeitschr. **109**, 103, 1920.

[2]) *O. Fürh* und *F. Lieben*, ebendaselbst, S. 123.

[3]) *F. Kretz*, ebendaselbst **130**, 86, 1922.

[4]) *E. Komm* und *E. Böhringer* (Labor. f. Lebensm. u. Gärungschem., Techn. Hochschule, Dresden), Zeitschr. f. physiol. Chem. **124**, 287, 1923.

aber konzentrierte Schwefelsäure einwirken ließen: Freies und gebundenes Tryptophan gibt mit Salzsäure, die Spuren Formaldehyd enthält, beim Zusatze von konzentrierter Schwefelsäure die charakteristische blauviolette Färbung, die sich auch zur kolorimetrischen Bestimmung verwerten läßt. Die Resultate der Autoren stimmen mit den unsrigen überein: Casein 2,3, 2,3 Proz. Tryptophan gegenüber *Fürth, Nobel, Lieben* 2,0 Proz. Wittepepton 5,3, 5,3 Proz., Tryptophan gegenüber *Fürth, Nobel, Lieben* 5,3 Proz.

Ery Lüscher[1]) schlägt bei der Tryptophanbestimmung den Ersatz des Formaldehyds durch *Benzaldehyd* vor und meint, die nach dem alten Vorgange erhaltenen Werte dürften um 30 bis 60 Proz. zu hoch sein. Im *Bence-Jones*schen Protein wurden so 2,89 Proz. Tryptophan gefunden.

Clarence E. May und *E. R. Rose*[2]) gingen so vor, daß sie zum Zwecke der Tryptophanbestimmung 0,05 bis 0,10 verschiedene Proteine unter Zusatz von *Ehrlichschem Reagens* (5proz. Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd in 10proz. H_2SO_4) mit 100 ccm 50proz. H_2SO_4 bei 35° 24 Stunden hydrolysierten und die entstandene Färbung nach 40 Stunden mit einer ebenso behandelten *Casein*lösung verglichen. Unter der Annahme, das Casein enthalte 1,5 Proz. (nach *Fürth und Mitarbeitern* etwa 2,0 Proz.) wurde berechnet: Für Lactalbumin 2,4 Proz., Eiereiweiß 1,1 Proz., Ovovitellin 1,7 Proz., verschiedene pflanzliche Proteine 1,0 bis 1,8 Proz., Zein 0, Gelatine 0.

O. Folin und *J. M. Looney*[3]) haben versucht, die Tryptophanbestimmung auf Grund eines völlig abweichenden Prinzips zu bewerkstelligen; die schöne Blaufärbung, welche *Phosphormolybdänsäure* unter bestimmten Bedingungen in alkalischer Lösung mit dem Tyrosin gibt, ist auch mit Tryptophan erhältlich. Die Autoren gingen nur zur Ermittlung des Tryptophangehaltes eines Proteins nach folgendem Prinzip vor: Sie unterwarfen dasselbe zunächst einer 40- bis 48stündigen *Barythydrolyse.* Nach Beseitigung des Baryts mit H_2SO_4 wurde die Trennung des Tyrosins vom Tryptophan durch Fällung des letzteren mit dem *Reagens von Hopkins-Cole* (10proz. Lösung von Mercurisulfat in 5proz. H_2SO_4) mit Hilfe der Zentrifuge durchgeführt. Der abgetrennte Tryptophanniederschlag wurde in starker Natriumcyanidlösung in Lösung gebracht und die Lösung der kolorimetrischen Prozedur unter Zuhilfenahme einer Tryptophanstandardlösung unterworfen. Die Methode gibt in Gemengen *reiner* Tyrosin- und Tryptophanlösungen anscheinend ganz ausgezeichnete Resultate (vgl. l. c., Tabelle I, S. 427). Die so in einigen Proteinen gefundenen Werte waren nun ganz auffallend, in manchen Fällen um die Hälfte niedriger als unsere Werte.

Der Wunsch, diesen auffallenden Widerspruch aufzuklären, hat uns nun veranlaßt, unsere methodischen Studien in bezug auf die Voisenetreaktion neuerlich aufzunehmen und nach verschiedenen Richtungen hin auszugestalten. Die größte Schwierigkeit, welche der Ermittlung des richtigen Tryptophangehaltes eines Proteins entgegensteht, ist wohl folgende: Man steht vor der Wahl, ob man das Trypto-

---

[1]) *E. Lüscher* (Cambridge biochem. Labor.), Biochem. Journ. **16**, 556, 1922.

[2]) *Clarence E. May* and *E. R. Rose* (Univ. of Indiana), Journ. of biol. Chem. **54**, 213, 1922.

[3]) *O. Folin* and *J. M. Looney*, ebendaselbst **51**, 421, 1922.

phan im *Verbande des Eiweißmoleküls* oder ***nach Loslösung aus demselben*** bestimmen will. Im ersteren Falle vermeidet man die Gefahr, das Tryptophan durch die Eingriffe der hydrolytischen Spaltung zu schädigen, hat aber keine Garantie dafür, daß nicht etwa insbesondere bei einer kolorimetrischen Bestimmung sich die Wirkung auxochromer oder färbungshemmender konstitutiver Einflüsse, vor allem aber die Wirkung der verschiedensten physikalisch-chemischen Faktoren in unliebsamer und schwer kontrollierbarer Weise geltend machen könnte. Im anderen Falle wiederum, wenn man es vorzieht, das Tryptophan, bevor man es der Bestimmung unterwirft, erst sorgfältig aus der Tiefe des Eiweißmoleküls herauszuschälen, besteht die große Gefahr, eine so labile Substanz, wie es diese Aminosäure zweifellos ist, zu schädigen. An eine *Säurehydrolyse* ist gar nicht zu denken. Wissen wir doch, daß das Tryptophan der einzige der bisher bekannten Bestandteile des Eiweißmoleküls ist, der bei der maximalen Säurehydrolyse restlos (unter „Melanoidin"bildung) zugrunde geht[1]). Jedoch auch bei der *Alkalihydrolyse* liegen die Dinge keineswegs einfach. *Herzfeld*[2]) hatte gefunden, daß alle Alkalien bei der Einwirkung auf *Tryptophan* Indol liefern, insbesondere die Natronlauge. Dagegen war bei Barythydrolyse nur eine minimale Indolbildung bemerkbar. Wir[3]) konnten uns zwar davon überzeugen, daß selbst konzentrierte Alkalilauge weder bei langdauernder Einwirkung bei Zimmertemperatur, noch aber bei kurzdauernder Einwirkung in der Wärme das Tryptophan wesentlich schädigt, andererseits hatten wir in Serumproben nach achtstündiger *Einwirkung von Barytlauge* am Wasserbade und noch mehr im Autoklaven bei 140° ein *starkes Absinken des kolorimetrischen Titers bemerkt, das wir* (*Fürth und Lieben*) *damals im Sinne einer Tryptophanzerstörung gedeutet haben*. *Annie Homer*[4]) hatte allerdings angenommen, daß selbst langdauernde Barythydrolyse praktisch keine Tryptophanverluste zur Folge habe. *H. C. Watermann*[5]) jedoch ist gegenteiliger Meinung: Seine neuen Versuche über Tryptophandarstellung durch Barytspaltung des Lactalbumins haben ihm die Überzeugung beigebracht: „that the baryte hydrolysis cannot be carried to completion without destruction of some of the tryptophane".

In sorgfältiger Weise hat *Onslow*[6]) im Laboratorium von *S. W. Cole* die relative Stabilität des Tryptophans der Barythydrolyse festgestellt.

---

[1]) Näheres diesbezüglich bei *O. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **116**, 224, 1921.

[2]) *Herzfeld*, ebendaselbst **56**, 82, 1913.

[3]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, ebendaselbst **109**, 137, 1920; **109**, 135, 1920.

[4]) *Annie Homer*, Journ. of biol. Chem. **22**, 269, 1915.

[5]) *H. C. Watermann* (Depart. of Agriculture Washington), ebendaselbst **56**, 75, 1923.

[6]) *H. Onslow*, diese Zeitschr. **15**, 283, 1921.

Es ergab sich dabei die merkwürdige Tatsache, daß *freies* Tryptophan von Baryt leicht zerstört wird, während die *Gegenwart von Produkten der Eiweißhydrolyse* das Tryptophan vor dem zerstörenden Einfluß des Baryts zu schützen vermag. Das gilt aber nicht für die Natronlaugehydrolyse, welche anscheinend auch bei Gegenwart von Hydrolysenprodukten ziemlich schnell ihre schädigende Wirkung geltend macht.

Es handelt sich hier also sozusagen um eine Wahl zwischen verschiedenen Übeln. Der Zweck der im folgenden mitgeteilten Untersuchungen war es, uns auf Grund eines möglichst reichhaltigen Beobachtungsmaterials darüber ein Urteil zu bilden, welches von den in Betracht kommenden unvermeidlichen Übeln als das kleinste zu veranschlagen wäre. Wir gingen also derart vor, daß wir eine Reihe von Proteinsubstanzen unter den verschiedensten Varianten durch Einwirkung verdauender Fermente, von Natron- oder Barytlauge in der Wärme und Kälte, sowie durch Lösen in starker Salzsäure immer wieder desintegrierten und immer wieder den „*kolorimetrischen Tryptophantiter*“, d. h. den (wirklichen oder scheinbaren) Tryptophangehalt mit Hilfe der *Voisenet*schen Reaktion oder aber mit Hilfe der Reaktion von *Folin-Looney* feststellten.

II. Versuche mit Casein.

Unsere früheren Versuche (*Fürth* und *Nobel*, l. c., S. 117) hatten ergeben

für Casein nach *Hammarsten* . . .	1,64 Proz.	Tryptophan
,, ,, ,, ,, . .	1,95 ,,	,,
käufliches Casein	2,10 ,,	,,
Caseinfällung aus frischer Milch . . .	2,18 ,,	,,
Caseinfällung mit Alaun	2,25 ,,	,,
Mittel . . .	2,02 Proz.	Tryptophan

Hopkins und *Cole* hatten bei der Tryptophandarstellung aus *Hammarsten*schem Casein eine Maximalausbeute von 1,5 Proz. erhalten. *Sanders* und *May* bekamen einen Wert von 1,60 Proz., *Komm* und *Böhringer* (l. c.) 2,3 Proz. *Annie Homer* (vgl. *Fürth* und *Lieben*, l. c., S. 136) erhielt nach Barytspaltung und Phosphorwolframsäurefällung in einem Falle einen Wert von 1,95, bei sechs weiteren Analysen 0,99 bis 1,24 Proz. Eine Versuchsserie ergab sehr konstant bei 20-, 40-, 60-, 80stündiger Barytspaltung 1,06 bis 1,13 Proz. *Dakin* hat bei Verdauung von Casein mit Pankreasextrakt nach seinem neuen Butylalkoholverfahren eine Tryptophanausbeute von 1,7 Proz. erhalten[1]).

[1]) Vgl. *A. Weil* in Abderhaldens biol. Arbeitsmethod., Abt. I, Teil 7, S. 50, 1922.

a) *Trypsinverdauung. Hammarsten*sches Casein in schwachem Alkali gelöst und die Lösung direkt der Voisenetbestimmung mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15, unterworfen, gab einen Wert von **1,7 Proz.** Tryptophan.

10 g desselben Präparates wurden in 200 ccm einer Phosphatpuffermischung[1]) $p_H = 7,1$ (Casein-Verdauungsoptimum) gelöst. Ein Teil dieser Lösung wurde durch 3 Wochen hindurch im Brutschranke unter Toluolzusatz der Einwirkung eines hochwirksamen Trypsinpräparates überlassen, das wir der Freundlichkeit der Firma Röhm und Haas, Darmstadt, verdankten. Die Kontrollösung wurde unter Toluol, jedoch ohne Trypsinzusatz im Brutschranke belassen. Nach Ablauf dieser Zeit war der kolorimetrische Titer auf **1,8 Proz.** abgesunken (Kolorimetrie mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15).

b) *Barytspaltung.* 10 g *Hammarsten*sches Casein wurden in 250 ccm H_2O unter Zusatz von 35 g Ätzbaryt unter Rückflußkühlung 48 Stunden lang gekocht. Sodann wurde ein aliquoter Teil abgetrennt und so viel H_2SO_4 hinzugefügt, daß die Flüssigkeit 5 Proz. H_2SO_4 enthielt. Nunmehr wurde einerseits die Bestimmung nach *Voisenet*, andererseits nach *Folin-Looney* durchgeführt. Die Hauptmenge des Barythydrolysates wurde durch Filtration von $BaCO_3$ befreit, die Barytkonzentration durch Titration ermittelt und so viel Ätzbaryt in Substanz hinzugefügt, daß nach Lösung desselben wieder die ursprüngliche Ätzbarytkonzentration erreicht wurde. Nunmehr wurde wieder 48 Stunden gekocht usw.

Voisenet ergab (mit HCl vom spezifischen Gewicht 1,15)

zu Beginn des Versuchs	**2,0 Proz.**	Tryptophan
nach 48stündiger Barythydrolyse	1,4 „	„
„ 96 „ „	1,2 „	„
„ 120 „ „	1,0 „	„

Die *Folin-Looney*-Bestimmung ergab während aller einzelnen Versuchsphasen etwas schwankende Einzelwerte zwischen 1,5 bis 2,0 Proz.

c) Eine genaue Wiederholung obigen Versuchs, jedoch mit der Abweichung, daß die Kolorimetrie statt mit HCl vom spezifischen Gewicht 1,15 mit *stärkerer Säure* vom spezifischem Gewicht 1,175 vorgenommen wurde, ergab

zu Beginn des Versuchs	**1,70 Proz.**	Tryptophan
nach 48 Stunden (direkt im Hydrolysat ohne Entfernung des Ba bestimmt)	1,64 „	„
nach 96 Stunden	1,50 „	„
„ 148 „	1,80 „	„

d) Schließlich sei ein präparativer Versuch größeren Umfanges angeführt, wobei 1 kg käuflichen Caseins in einem emaillierten, mit Rückflußkühler versehenen Eisentopfe mit 7 Liter Brunnenwasser und 870 g Ätzbaryt 48 Stunden lang gekocht wurde. Sodann wurde in eine große Schale überspült, mit einem Überschuß konzentrierter H_2SO_4 gefällt, das $BaSO_4$ abgenutscht und der $BaSO_4$-Niederschlag sorgfältig ausgekocht. Die Voisenetbestimmung in den vereinigten Filtraten ergab (umgerechnet auf das Casein) nur **1 Proz.** Tryptophan.

---

[1]) 70 ccm 2 m/15 $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ + 40 ccm Naf 2 Proz. + 60 ccm m/15 KH_2PO_4 + 30 ccm H_2O.

Überblicken wir die Gesamtheit dieser Resultate, so ergibt sich, da ja die effektive untere Grenze des Tryptophangehaltes nach den Ausbeuten, die *Hopkins* und *Cole* einerseits, *Dakin* andererseits erzielt hatten, mit 1,5 bis 1,7 Proz. festgelegt ist, daß ***hier sowohl bei der langdauernden Trypsinverdauung als auch bei der langdauernden Barythydrolyse sicherlich ein wirklicher oder scheinbarer Verlust an Tryptophan stattgefunden hatte.***

III. Versuche mit Fibrin.

Eine weitere Versuchsserie wurde mit Fibrin ausgeführt. Hier hatte eine frühere Versuchsserie befriedigende Übereinstimmung ergeben (*Fürth-Lieben*, l. c., II, S. 140). Lösung in NaOH (10proz.): 5,6 Proz.; durch kurzdauernde, etwa dreitägige Trypsinverdauung 5,1, 5,9, 4,7, 5,1 Proz., nach 16stündiger Barythydrolyse 5,2 Proz., nach kombinierter Pepsin-Trypsinverdauung 5,3 Proz. — ferner (*Fürth-Lieben*, III, diese Zeitschr. **109**, 156): nach Trypsinverdauung bis zu oben erfolgter Lösung 5,1 Proz. Tryptophan.

a) *Pepsin-Trypsinverdauung.* Fibrin, unter Alkohol aufbewahrt, wurde mit Wasser ausgewaschen, ausgepreßt und zwischen Filtrierpapier abgetrocknet. Enthielt 39 Proz. Trockensubstanz. Wurde in Pepsinsalzsäure unter Toluolzusatz 2 Tage im Brutofen belassen, worauf vollständige Lösung erfolgt war. Nunmehr wurde Phosphatpuffermischung und so viel NaOH hinzugefügt, daß eben Farbenumschlag gegen Phenolphthalein erfolgte. Voisenet ergab nunmehr, auf die Fibrinmenge umgerechnet **4,6 Proz.** Tryptophan. Es wurde weiterhin Trypsin hinzugefügt. Nach 2 Wochen im Brutofen war der kolorimetrische Titer auf **3,8 Proz.** abgesunken.

b) Analoger Versuch mit 100 g frischen Fibrins, unter Anwendung von „Pancreatinum activum“ und von Natriumfluorid als Antiseptikum und unter Kontrolle eines Parallelversuches ohne Trypsinzusatz ergab im Brutofen im Laufe von 6 Wochen ein Absinken des Voisenet-Titers (mit 1,15 proz. HCl) von **5,8** auf **4,4 Proz.** Tryptophan.

c) *Barythydrolyse.* 5 g Fibrin in 125 ccm H_2O mit 17½ g Ätzbaryt 24 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht, sodann mit 40 ccm 50proz. H_2SO_4 angesäuert und so viel Wasser hinzugefügt, daß die Lösung einer 1proz. Fibrinlösung entsprach. Nach Filtration des $BaSO_4$ und Vertreibung des H_2S ergab Voisenet mit 1,15 proz. HCl den gewohnten Wert von **4,9 Proz.** Tryptophan. Ein aliquoter Teil weitere 24 Stunden mit Baryt hydrolysiert, ergab einen weit geringeren kolorimetrischen Titer: **3,4 Proz.** (wobei allerdings zu beachten ist, daß diesmal sowohl Standard als Probe mit einer weit konzentrierteren Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,17 angesetzt worden waren). Wir gingen nun weiter so vor, daß wir aus einer geringen Menge des Barythydrolysates, nachdem wir dasselbe auf einen H_2SO_4-Gehalt von 5 Proz. gebracht hatten, das Tryptophan mit dem *Hopkins*schen Reagens niederschlugen, den mit Hilfe der Zentrifuge abgetrennten Niederschlag direkt in der konzentrierten HCl lösten und die Voisenetbestimmung vornahmen. Wir erhielten so **3,2 Proz.** Tryptophan, also einen Wert, der dem von *Folin-Looney* ermittelten Werte 2,9 Proz. nahestand.

d) *Ausführung der Voisenetreaktion mit hochkonzentrierter HCl, Barythydrolyse.* Wir gingen nun weiter so vor, daß wir zur Ausführung der Voisenetreaktion nicht wie bisher 1,15 proz., sondern 1,17 proz. HCl benutzten.

Eine Fibrinprobe in 30proz. KOH durch halbstündiges Erwärmen gelöst, gab direkt bei der Voisenetkolorimetrie zu unserer Überraschung einen Wert von **3,3** bis **3,6 Proz.** Barythydrolyse in der Dauer von 3, 8, 24 Stunden vermochte nunmehr den kolorimetrischen Titer nicht weiter herunterzudrücken. Derselbe hielt sich vielmehr um **3,7 Proz.** herum.

e) *Vergleich konzentrierter Salzsäure verschiedener Stärkegrade, Barythydrolyse.* Fibrinproben, in 30proz. KOH gelöst, ergaben beim Voisenet mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15, den gewohnten Wert: **5,3 Proz.** Tryptophan; mit HCl, spezifisches Gewicht 1,175, dagegen nur **3,5 Proz.** Tryptophan. Nach Barythydrolyse ein noch etwas niedrigerer Wert: nach 24 Stunden und ebenso auch nach 48 Stunden **2,8 Proz.**

f) *Hydrolyse mit Natronlauge.* Zu präparativen Zwecken wurden je 500 g trockenen Fibrins in einem Eisengefäße mit aufgesetztem Rückflußkühler mit 5 Liter Wasser und 250 g Ätznatron 50 Stunden lang gekocht, sodann wurde mit H_2SO_4 neutralisiert. Die kolorimetrische Ausbeute an Tryptophan in diesem Stadium betrug in dem einen Falle **4,6 Proz.**, in dem anderen Falle jedoch nur **3,3 Proz.**

Diese Beobachtungen ließen uns das ganze Problem in seiner ganzen Schwierigkeit erkennen; sie gestatten aber zugleich in ihrem Zusammenhange, die Frage unter einem anderen Gesichtswinkel zu betrachten, als sie sich bisher uns und anderen präsentiert hatte. Die Tatsache, daß die *absolute Intensität* der *Voisenet*schen Farbenreaktion durch Wasserzusatz geschwächt, durch Erhöhung der Säurekonzentration aber erhöht werde, war uns allerdings wohlbekannt und ist seinerzeit auch spektrophotometrisch registriert worden (*Fürth-Lieben*, l. c., II, S. 130 bis 132). Für die Auswertung reiner Tryptophanlösungen verschiedener Konzentration hatte es sich als ziemlich gleichgültig erwiesen, ob man die Reaktion mit stärkerer oder schwächerer Salzsäure anstellte, vorausgesetzt nur, daß man, wie selbstverständlich, nur immer Testflüssigkeit und Standard mit derselben Säure ansetzte. Nun aber sahen wir uns hier einem factum novum gegenüber, wobei wir es nun freilich nicht, wie seinerzeit, mit einer Lösung reinen Tryptophans, vielmehr mit dem in der Tiefe des Fibrinmoleküls verborgenen Tryptophankomplex zu tun hatten. *Hier sahen wir unerwarteterweise den kolorimetrischen Voisenettiter alsbald von seiner Höhe heruntergleiten, sobald wir die konzentrierte Salzsäure durch eine noch viel stärkere ersetzten. Das gleiche Heruntergleiten des Titers etwa von 5 Proz. Tryptophan auf rund 3½ Proz. sahen wir nun auch immer und immer wiederkehren, wenn wir, sei es durch Ferment-, sei es durch Alkalihydrolyse, den Verband des Moleküls in ausgiebiger Weise gesprengt hatten.*

Das mußte uns zu denken geben und uns veranlassen, den Kreis unserer Beobachtungen zu erweitern. Wir taten dies zunächst in bezug

auf das dem Fibrin nahestehende, durch seine Leichtlöslichkeit ausgezeichnete *Wittepepton*, welches ja, wie bekannt, durch ausgiebige Pepsinverdauung aus frischem, ausgewaschenem Fibrin gewonnen wird.

IV. Versuche mit Wittepepton.

In früheren Versuchen hatten wir (*Fürth-Lieben*, l. c., II) im Wittepepton im Mittel **5,3 Proz.** Tryptophan gefunden. Genau denselben Wert (5,3 Proz.) hatten *Komm* und *Böhring* (l. c.) mit ihrer Modifikation dieser Methode erhalten. Nach *Folin* und *Looney* hatte sich jedoch ein erheblich niedrigerer Wert (3,03 Proz.) ergeben.

a) *Lösung in konzentrierter Salzsäure.* Wir lösten 0,1 g Wittepepton in 10 ccm *konzentrierter Salzsäure* (spezifisches Gewicht 1,19) in der Kälte. Mit 2 ccm der Lösung wurde die Reaktion in gewohnter Weise angestellt; ergab **3,3 Proz.** Tryptophan.

b) *Lösung in konzentrierter Salzsäure.* 0,5 g Wittepepton (bei 110° getrocknet) wurden in 10 ccm konzentrierter HCl (spezifisches Gewicht 1,19) (pro Analysi) in der Kälte gelöst. Die Probe in folgender Weise angestellt: 2 ccm der Lösung + 2 ccm H_2O + 11 ccm konzentrierter HCl + 1 Tropfen 2proz. Formaldehyds; nach 10 Minuten 10 Tropfen 0,05proz. $NaNO_2$. Auffüllen auf 20 ccm.

Die Färbung wurde mit der Standardlösung verglichen, nämlich: 2 ccm 0,1proz. Tryptophanlösung (*Merck*, in Naf 2 Proz.) + 13 ccm konzentrierter HCl + 1 Tropfen 2proz. Formaldehyds, nach 10 Minuten + 10 Tropfen 0,05proz. $NaNO_2$. Auffüllen auf 20 ccm.

Der kolorimetrische Vergleich ergab für das Wittepepton einen Gehalt von **2,8 Proz.** Tryptophan. Eine teilweise Zerstörung des Tryptophans erscheint in diesem Falle nicht unwahrscheinlich. (Vgl. Versuch d.)

c) *Einfluß der Salzsäurekonzentration.* 1 g Wittepepton wurde in 40 ccm 30proz. NaOH in der Kälte gelöst.

Voisenet mit HCl (spezifisches Gewicht 1,15) ergab diesmal einen ungewöhnlich hohen Wert von 5,9 Proz. Tryptophan. Eine andere Probe, direkt in HCl (spezifisches Gewicht 1,17) gelöst, ergab beim kolorimetrischen Vergleich einen um etwa 40 Proz. schwächeren Wert.

d) *Trypsinverdauung.* 1 g Wittepepton wurde in 40 ccm einer Phosphatpuffermischung heiß gelöst. Der Niederschlag von Heteroalbumose abfiltriert. Voisenet, ausgeführt mit HCl (spezifisches Gewicht 1,17), ergab einen Gehalt von **5,0 Proz.** Tryptophan, also unseren alten Wert. Nunmehr wurde mit 0,1 g Trypsin (*Kahlbaum*) unter Toluolzusatz im Brutofen verdaut. Nach einer Woche scheinbarer (offenbar vom Trypsinzusatz herrührende) Vermehrung des Tryptophangehaltes auf 5,5 Proz. Nach einer Woche Absinken auf **4,2 Proz.** Tryptophan. (Kolorimetrisch gegen Tryptophanstandard und HCl, spezifisches Gewicht 1,15.)

e) *Trypsinverdauung.* 2 g Wittepepton in 80 ccm Phosphatpuffermischung ($p_H = 8,1$) heiß gelöst, Heteroalbumose abfiltriert, dazu Trypsin und 17 ccm n/10 NaOH und einige Tropfen Phenolphthalein. Das nunmehr schwach rosa gefärbte Gemisch wurde nach Toluolzusatz sich selbst überlassen. Voisenet (Kolorimetrie durch Vergleich mit der unverdauten Probe, die ihrerseits zu Beginn des Versuchs mit dem Tryptophanstandard verglichen worden war).

Sogleich	Nach 8 Tagen	Nach 17 Tagen	Nach 33 Tagen
4,7 Proz.	4,2 Proz.	3,2 Proz.	3,1 Proz.

f) *Barytspaltung, Fällung nach Hopkins.* 5 g Wittepepton wurden mit 100 ccm H_2O und 20 g Ätzbaryt unter Rückflußkühlung 48 Stunden gekocht, filtriert und der Rückstand mit Wasser nachgewaschen. Im Filtrate wurde Ba mit H_2SO_4 ausgefällt, dazu so viel 50proz. H_2SO_4, daß nach Auffüllen auf 500 ccm der H_2SO_4-Gehalt 5 Proz. betrug. Sodann wurde mit dem *Hopkins*schen Reagens ausgefällt. Der tryptophanhaltige Niederschlag wurde nach 3 Stunden abfiltriert, mit dem Fällungsmittel ausgewaschen, schließlich in 2proz. HCl suspendiert und mit H_2S zerlegt. Das HgS wurde abfiltriert und noch einmal mit H_2O ausgekocht. Die Voisenetbestimmung, ausgeführt mit reiner HCl (spezifisches Gewicht 1,175), ergab für das Ausgangsmaterial einen Gehalt von **3,3 Proz.** Tryptophan.

Es ergab sich weiterhin die beachtenswerte und für die Frage der präparativen Gewinnung des Tryptophans wichtige Tatsache, daß, zum Unterschied vom im Eiweißverbande befindlichen Tryptophan, das, wie bekannt, sehr schnell von konzentrierten Säuren unter Melanoidinbildung zerstört wird, die *durch das Reagens von Hopkins abgetrennte Fraktion nunmehr ziemlich widerstandsfähig gegen Säure geworden ist.* Nach 16stündigem Kochen mit 25proz. H_2SO_4 ergab sich eine Abnahme des Voisenettiters um nur etwa 20 Proz.

g) *Protrahierte Trypsinverdauung* in Phosphatpuffermischung $p_H = 8,1$, die so viel NaF gelöst enthielt, daß der Gehalt daran 0,3 Proz. betrug.

Es ergab sich hier ein sehr langsames Absinken des Voisenettiters nach Maßgabe der fortschreitenden Verdauung (Kolorimetrie mit HCl, spezifisches Gewicht 1,155) gegen die unverdaute Kontrollprobe.

Zu Beginn	Nach 16 Tagen	Nach 43 Tagen	Nach 70 Tagen
5,3 Proz.	4,3 Proz.	4,2 Proz.	3,3 Proz.

(Zusatz eines hochwirksamen Trypsinpräparats von Röhm u. Hass, Darmstadt.)

h) *Protrahierte Trypsinverdauung*, ähnlich wie der vorige Versuch in Phosphatpuffermischung ($p_H = 8,3$).

Abnahme des Voisenet-Titers (HCl, spezifisches Gewicht 1,155).

Zu Beginn	Nach 17 Tagen	Nach 48 Tagen
5,3 Proz.	3,6 Proz.	3,4 Proz.

i) *Tryptische Verdauung.* Der kolorimetrische Titer (Voisenet mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15) war im Verlaufe von 2½ Wochen von **5,3** auf **3,5 Proz.** Tryptophan abgesunken. Wurde die Reaktion dagegen mit der starken Salzsäure ausgeführt, so ergab sich sogleich ein niederer Wert von **3,6 Proz.**, der im Laufe der weiteren Verdauung keine weitere merkliche Abnahme mehr zeigte.

k) *Hydrolyse mit 4proz. Natronlauge.* Die Voisenetbestimmung wurde in den einzelnen Phasen vergleichsweise mit HCl vom spezifischen Gewicht 1,150 bzw. 1,185 ausgeführt.

	Voisenet mit der schwächeren Säure Proz.	Voisenet mit der stärkeren Säure Proz.
Sogleich	5,3	3,3
Nach 48 Stunden . .	4,0	—
„ 96 „ . .	3,2	2,5
„ 120 „ . .	3,0	—

l) *Barythydrolyse.* 10 g Wittepepton mit 250 ccm H_2O und 35 g Ätzbaryt unter Rückflußkühlung gekocht und, unter titrimetrischer Kontrolle, der

Ätzbarytgehalt durch neuerlichen Zusatz von Ätzbaryt auf etwa 14 Proz. erhalten. Voisenet mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15:

Sogleich	Nach 48 Stunden	Nach 96 Stunden	Nach 144 Stunden
5,3 Proz.	3,5 Proz.	3,3 Proz.	3,5 Proz.

Wurde die Voisenet-Bestimmung mit starker HCl, spezifisches Gewicht 1,185, ausgeführt, *so trat bereits ohne Hydrolyse der niedere Voisenetwert zutage, ohne durch die nachfolgende Hydrolyse weiter heruntergedrückt zu werden.*

Die gleiche Stabilisierung ergab sich bei Kontrolle der Hydrolysate nach dem Verfahren von *Folin* und *Looney.*

m) *Barythydrolyse.* 10 g Wittepepton (durch 24 Stunden bei 110° getrocknet) wurden mit 250 ccm Wasser und 35 g Ätzbaryt 48 Stunden lang hydrolysiert.

Das Hydrolysat, direkt, ohne Ausfällung des Ätzbaryts unter Anwendung von HCl, spezifisches Gewicht 1,175, gegen eine Tryptophanstandardlösung kolorimetriert, ergab **4,4 Proz.** Tryptophan. Eine andere Portion des Hydrolysates nach Beseitigung des Baryts mit H_2SO_4 kolorimetriert, ergab **3,9 Proz.** Tryptophan.

Überblicken wir nunmehr die vorliegenden zahlreichen, das Fibrin und das Wittepepton betreffenden Beobachtungen, so ist das Ergebnis in Kürze folgendes:

Das Fibrin ergibt bei der Voisenetbestimmung mit der schwächeren Salzsäure einen kolorimetrischen Titer von rund 5 Proz. Tryptophan. Die ausgiebige Verdauung mit *Pepsin,* wie sie der Umwandlung des Fibrins in „Wittepepton" entspricht, bewirkt keine Verschiebung dieses Titers. Greift aber die *tryptische Verdauung* oder aber eine *Alkalihydrolyse* (mit Ätzbaryt oder Ätznatron) ein, so sinkt der kolorimetrische Titer allmählich ab, um sich schließlich um 3 Proz. herum einigermaßen zu stabilisieren. Wird die Voisenetbestimmung mit der hochkonzentrierten Salzsäure ausgeführt, so tritt auch ohne vorausgegangene hydrolytische Spaltung sogleich ein niedrigerer Wert in Erscheinung.

V. Versuche mit einigen anderen Proteinen.

A. *Lactalbumin.*

Voisenet mit der stärkeren Säure ergab sowohl nach 60stündiger, als auch nach 108stündiger Barythydrolyse eine Stabilisierung auf **2,8 Proz.** Tryptophan; *Fürth-Lieben* hatten direkt mit der schwächeren Säure 2,9 Proz. Tryptophan gefunden; *May* und *Rose* mit ihrem Vorgange 2,4 Proz.

B. *Serumglobulin.*

Fürth und *Lieben* (vgl. diese Zeitschr. **116**, 235, 1921) hatten in verschiedenen Globulinfraktionen von normalen und Immunseris beim Arbeiten mit der schwächeren Salzsäure Werte zwischen 3,3 bis 5,2 Proz. Tryptophan erhalten. *Kiyotaki*[1]) hat in diesem Laboratorium den Tryptophangehalt des Serumglobulins mit 4,0 Proz. veranschlagt. Bei Benutzung der stärkeren Salzsäure ergab sich nunmehr für ein Serumglobulinpräparat nach Lösung

[1]) *U. Kiyotaki,* diese Zeitschr. **134**, 333, 1922.

in 30proz. KOH: **3,1** bis **3,4 Proz.** Nach 48stündiger Barythydrolyse **2,8** bis **2,6 Proz.**, nach 96stündiger Barythydrolyse **2,4 Proz.** Ein anderes (nach dem Ammonsulfatverfahren dargestelltes koaguliertes) Globulinpräparat aus Pferdeserum ergab nach Lösung in 30proz. KOH unter Anwendung von HCl, spezifisches Gewicht 1,17, **4,1 Proz.** Tryptophan, mit HCl, spezifisches Gewicht 1,19 Proz. jedoch nur **2,6 Proz.** Tryptophan.

C. Edestin.

Direkt in 30proz. KOH gelöst, kolorimetriert mit HCl, spezifisches Gewicht 1,15, **3,0 Proz.**, mit HCl, spezifisches Gewicht 1,17, **2,1 Proz.** Nach 48stündiger Barythydrolyse **1,6 Proz.**, nach 96stündiger Barythydrolyse **1,6 Proz.** Also auch hier Stabilisierung!

VI. Verhalten reinen Tryptophans in Mischung mit Gelatine gegen Barytlauge.

Wir setzten a) 0,15 g Tryptophan + 5 g Gelatine + 17½ g Ätzbaryt + 125 ccm H_2O in einem Kolben mit aufgesetztem Rückflußkühler zu einem 48stündigen Hydrolysenversuch an. Die Parallelprobe b) unterschied sich von a) nur durch Fehlen des Tryptophanzusatzes, das hier erst *nach* vollzogener Barythydrolyse hinzugefügt wurde. Die nach Beseitigung des Baryts durch H_2SO_4 vorgenommene Voisenetbestimmung ergab für $^3/_5$ von

a) statt 0,060 g Tryptophan . . . . 0,059 g
b) „ 0,060 g „ . . . . 0,056 g

Es hatte also bei Gegenwart der beim Zerfall der Gelatine resultierenden Eiweißspaltungsprodukte im Verlaufe einer 48stündigen Barythydrolyse keine merkliche Tryptophanzerstörung stattgefunden.

Nun fehlen aber gerade zwei der reaktionsfähigsten Eiweißspaltungsprodukte in der Gelatine: das *Cystin* und das *Tyrosin.*

Um diesen Mangel zu ergänzen, wurde c) wie a), aber unter weiterem Zusatz von 0,1 g Tyrosin + 0,1 g Cystin angesetzt.

Jedoch auch hier vermochte eine 48stündige Barythydrolyse *keine deutliche Zerstörung des Tryptophans* zu bewirken.

Wir gelangen also zu der für uns wichtigen Schlußfolgerung, daß *das Tryptophan in der Tat durch eine hochgradige Resistenz gegenüber der Barythydrolyse bei Gegenwart von anderen hydrolytischen Eiweißspaltungsprodukten ausgezeichnet ist.*

Diese Resultate stehen in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen, zu denen *Onslow* im Cambridger Laboratorium gelangt ist.

VII. Relative Unabhängigkeit der Voisenetreaktion vom Wasserzusatze in Eiweißlösungen im Gegensatz zu reinen Tryptophanlösungen.

A. Wittepepton.

Wittepepton in reiner HCl, spezifisches Gewicht 1,175, direkt zu 2 Proz. gelöst. Von der Lösung wurden je 20 ccm zur Voisenetreaktion wie gewöhnlich verwendet, es wurde jedoch in

a) 4 ccm H_2O + 11 ccm HCl, spezifisches Gewicht 1,175
b) 2 „ „ + 13 „ „ „ „ 1,175
c) 0 „ „ + 15 „ „ „ „ 1,175

angewandt.

Wird die Färbungsintensität der mit unverdünnter HCl angesetzten Probe = 1 gesetzt, so ergab b) gleichfalls 1, c) 0,87.

Also: *wenig* Wasser war *ohne Einfluß* geblieben, *viel* Wasser hatte nur eine mäßige Abschwächung der Färbungsintensität (um 13 Proz.) herbeigeführt.

Wurde dagegen ein analoger Versuch mit reiner *Tryptophanlösung* durchgeführt, so ergab c) = 1, b) = 0,77, a) = 0,65, also eine *sehr starke Abschwächung der Färbungsintensität durch den Wasserzusatz.*

B. Edestin.

Analoger Versuch: c) = 1, b) = 0,92, a) = 0,84.

C. Casein.

Analoger Versuch: c) = 1, b) = 1,0, a) = 0,95.

D. Serumalbumin.

Durch fraktionierte Ammonsulfatfällung aus Pferdeblutserum gewonnen, koaguliert, sulfatfrei gewaschen, ein Teil feucht in verdünntem Alkali gelöst mit Voisenet:

a) 1 ccm Lösung + 14 ccm HCl spezifisches Gewicht 1,175 + 0 ccm H_2O,
b) 1 „ „ + 11 „ „ „ „ 1,175 + 3 „ „ .

Bei a) und b) ergab Voisenet die gleiche Färbungsintensität.

Wurde mit einer *maximal verdauten Wittepeptonprobe* (Versuch IV, i) die Kolorimetrie vergleichsweise unter Anwendung von HCl, spezifisches Gewicht 1,15 und 1,19, ausgeführt, so fiel die Reaktion in letzterem Falle ungefähr doppelt so stark aus. Sie verhielt sich in dieser Hinsicht etwa wie eine *reine Tryptophanlösung*, bei der, wie seinerzeit die spektrophotometrische Beobachtung gelehrt hat (*Fürth-Lieben*, l. c., S. 131), ein Anstieg der HCl-Konzentration vom spezifischen Gewicht 1,15 auf 1,20 eine (ceteris paribus) doppelt intensive Farbenreaktion ergeben hatte.

Weiterhin wurde ein Barythydrolysat (Versuch IV, n) vergleichsweise mit HCl, spezifisches Gewicht 1,175 und 1,15, kolorimetriert. Die Relation der Färbungsintensität zugunsten der stärkeren Säure betrug 1 : 0,7. Andere Versuche (s. unten) haben ergeben, daß *nicht hydrolysierte Eiweißkörper* hinsichtlich der Intensität der Voisenetfärbung von den *Schwankungen der Säurekonzentration* nur wenig abhängig sind. *Es ist also klar, daß, wenn man die Kolorimetrie mit der schwächeren Säure ausführt und hydrolysiertes und nicht hydrolysiertes Wittepepton miteinander vergleicht, von vornherein sich aus diesem Um-*

stande ein scheinbares Minus zuungunsten der hydrolysierten Probe ergeben mußte, auch wenn tatsächlich keine Zerstörung stattgefunden hätte.

Eine ebensolche Abhängigkeit der Färbungsintensität von der Salzsäurekonzentration wies das *Caseinhydrolysat* nach 48stündiger Barythydrolyse (Versuch II, c) auf.

Wir gelangen also zu der für unsere Beobachtungen wichtigen Schlußfolgerung, daß bei Anstellung der Voisenetreaktion mit *Eiweißlösungen* (im Gegensatz zu Lösungen von *freiem, reinem* Tryptophan) die *erzielte Färbungsintensität in weiten Grenzen von der Konzentration der angewandten Salzsäure unabhängig ist.*

VIII. Diskussion der Versuchsresultate.

1. Wir wollen nun an der Hand der vorliegenden Erfahrungen den Versuch machen, uns über die sich daraus ergebenden Schlußfolgerungen klar zu werden.

Wir haben gesehen, daß, wenn wir den Tryptophangehalt eines Proteins zu ermitteln versuchen, der kolorimetrische Voisenettiter (also die relative Intensität der Färbung, gemessen an der Färbungsintensität einer Standardlösung von reinem Tryptophan bei Einhaltung genau gleicher Versuchsbedingungen) alsbald abgesunken ist:

a) Wenn wir, anstatt eine Lösung des *nativen* Proteins zu kolorimetrieren, dieselbe zunächst einer *weitgehenden tryptischen Verdauung* unterworfen hatten. Dagegen blieb diese Erniedrigung des kolorimetrischen Titers aus, wenn der Eiweißkörper (Fibrin) einer ausgiebigen *Pepsinverdauung* (zu Wittepepton!) unterworfen oder etwa nur durch eine *kurzdauernde* Trypsinverdauung aus der koagulierten in eine wasserlösliche Form überführt worden war. Wir haben daraus den Eindruck gewonnen, daß das Absinken des kolorimetrischen Titers nicht sowohl an eine *Zertrümmerung des intakten tryptophanhaltigen Proteinmoleküls* geknüpft ist (denn eine solche vollzieht sich ja zweifellos auch, wenn etwa Fibrin durch Pepsin- oder kurzdauernde Trypsinverdauung in ein Gemenge von leichtlöslichen Polypeptiden übergeführt wird), vielmehr an das *Infreiheitsetzen des Tryptophans aus seinen Polypeptidbindungen* (also etwa nach Maßgabe, als das Tryptophan seine Ausschälung durch den Eintritt der charakteristischen Bromreaktion kundgibt, welche ja bekanntlich nur dem freien, nicht aber dem polypeptidartig gebundenen Tryptophan eigentümlich ist).

b) Wir haben ferner ein Absinken des kolorimetrischen Titers beobachtet, wenn wir das Proteinmolekül durch eine sehr *langdauernde Alkalihydrolyse* (sei es mit Kali- oder Natronlauge oder mit Barytwasser) weitgehend desintegriert hatten. Dagegen konnten Proteine in heißer konzentrierter Alkalilauge gelöst, ja sogar einige Zeitlang mit einer solchen erwärmt werden, ohne daß der Abfall des kolorimetrischen

Titers bemerkbar wurde. Also auch hier scheint der Abfall des Titers nicht an den ersten Angriff des destruierenden Agens geknüpft, sondern wiederum erst an die *Ausschälung des Tryptophans* aus seinem Gefüge.

c) Wird bei Ausführung der *Voisenet*schen Reaktion mit einer Eiweißlösung die gewöhnlich konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,15) durch eine solche von noch *höherem Konzentrationsgrade* ersetzt (spezifisches Gewicht 1,17 bis 1,19), so bemerkt man alsbald ein Absinken des kolorimetrischen Titers beim Kolorimetrieren gegen eine Standardlösung von *reinem Tryptophan*, wobei es ziemlich gleichgültig scheint, ob das Protein erst in Alkali gelöst und sodann mit der konzentrierten Säure versetzt, oder aber direkt in der letzteren in der Kälte in Lösung gebracht wird.

2. Nun würde ja die Sachlage zweifellos sehr an Klarheit und Einfachheit gewinnen, wenn wir uns dabei beruhigen könnten, daß überall dort, wo wir ein Absinken des kolorimetrischen Tryptophantiters wahrgenommen haben, eben eine *Schädigung oder Zerstörung des Tryptophans* wirklich stattgefunden habe.

Wie liegt die Sache nun im Falle a), bei der *tryptischen Verdauung*? Haben wir irgend einen triftigen Grund, um anzunehmen, daß das Tryptophan dabei geschädigt werde? *S. Fränkel* und *K. Gallia*[1]) haben kürzlich auf die Bildung von *Anhydriden* aus dem Tryptophan und Tyrosin bei der prolongierten tryptischen Verdauung hingewiesen. Die Möglichkeit struktureller Umlagerungen bei den auf mehrere Wochen ausgedehnten Versuchen muß sicherlich eingeräumt werden. Eine andere Frage aber ist es, ob sie wahrscheinlich sei. Eine tryptische Zerstörung des Tryptophans müßte doch immer weiter fortschreiten. Anstatt dessen sehen wir beim Fibrin und Wittepepton immer wieder die *Tendenz zur Einstellung auf ein bestimmtes Niveau zwischen 3 bis 3,5 Proz. sowohl bei den Verdauungs- als bei den Alkalihydrolyseversuchen.*

Betrachten wir nun den Fall b), die *hydrolytische Alkalispaltung.* Hier muß es doch in hohem Grade auffällig erscheinen, daß auch hier sorgfältige Analysen bei fünf verschiedenen Eiweißkörpern (Fibrin, Wittepepton, Lactalbumin, Serumglobulin und Edestin) bei fortgesetzter Barythydrolyse keine stetige Abnahme des kolorimetrischen Titers ergeben haben, vielmehr *die Einstellung auf ein bestimmtes Niveau.* (Bei einem Protein, dem Casein, haben wir allerdings eine solche Einstellung vermißt und haben wir die Voisenetwerte auf ein sicherlich viel zu tiefes Niveau absinken gesehen.) Haben wir überhaupt einen triftigen Beweis dafür, daß das Tryptophan ohne weiteres von der Barytlauge angegriffen wird? Für *reines* Tryptophan wird dies von *Onslow* allerdings angenommen, nicht aber für Tryptophan bei Gegen-

[1]) *S. Fränkel* und *K. Gallia*, diese Zeitschr. **134**, 321, 1922.

wart von Produkten der Eiweißhydrolyse. Wir selbst haben gesehen, daß Tryptophan bei Gegenwart von Gelatine selbst tagelanges Kochen mit Barytlauge verträgt, und zwar auch bei weiterem Zusatz von Cystin und Tyrosin. Wir können also nicht behaupten, daß sich irgend eins der gewöhnlichen hydrolytischen Eiweißspaltungsprodukte bei Gegenwart von Lauge in der Siedehitze etwa ohne weiteres mit dem Tryptophan unter Zerstörung des letzteren umsetze.

Und noch ein Umstand, der hier vielleicht nicht bedeutungslos ist: Falls eine Zerstörung des Tryptophans durch das Alkali wirklich stattfindet, so wäre doch wohl vor allem eine *Abspaltung der Aminogruppe in Form von Ammoniak* zu erwarten, demnach eine stetige Zunahme des „Säureamidstickstoffs". Nun liegt gerade aus jüngster Zeit eine sorgfältige, im Laboratorium *Th. B. Osbornes* ausgeführte Untersuchung über den Säureamid-N des Gliadins vor[1]). Dieses Protein enthält etwa ein Viertel seines Gesamt-N in Form von lockerem Säureamid-N. Es hat sich nun gezeigt, daß dieser Säureamid-N schon durch Kochen mit sehr verdünnten Alkalien im Verlaufe weniger Stunden abgespalten wird. Die Kurven (Zeit als Abszisse, Prozent NH_3 vom Gesamt-N als Ordinate) steigen steil auf, biegen dann horizontal um und verlaufen weiter horizontal. Wäre das kochende Alkali [n NaOH oder 0,2 n $Ba(OH)_2$] hier wirklich imstande gewesen, in kontinuierlicher Arbeit das Tryptophan oder eine andere Aminosäure unter Loslösung ihrer NH_2-Gruppe zu zerstören, so müßten doch die Kurven, wenn auch langsam, so doch stetig ansteigen.

Eines bleibt allerdings immerhin möglich: die Sache könnte so liegen, daß das *einmal aus dem Polypeptidverbande herausgelöste Tryptophan sich zwar leidlich resistent gegen die protrahierte Alkaliwirkung verhält, daß aber bei der Loslösung des Tryptophans aus dem Verbande das Tryptophan geschädigt oder doch derart umgelagert wird, daß sein Voisenettiter absinkt.* Leider kann diese Möglichkeit vorderhand weder widerlegt noch bewiesen werden. Es bleibt eben nichts anderes übrig, als sie einstweilen ad notam zu nehmen.

3. Wir gelangen schließlich zur Erörterung des Falles c). Wie sollen wir die Tatsache verstehen, daß der kolorimetrische Titer, also der (wirkliche oder scheinbare) Tryptophangehalt eines Proteins, absinkt, wenn wir die Voisenetkolorimetrie anstatt mit der gewöhnlichen konzentrierten *Salzsäure* (spezifisches Gewicht 1,15) mit einer solchen von *noch höherer Konzentration* (spezifisches Gewicht 1,17 bzw. 1,19) ausführen.

Handelt es sich hier wirklich um eine *Schädigung oder Zerstörung* des Tryptophans? Möglich wäre dies ja immerhin, denn wir wissen ja, daß konzentrierte Salzsäure Tryptophan nicht nur sehr schnell beim Erwärmen, sondern langsam auch schon in der Kälte angreift. Weit plausibler dürfte aber folgende Erklärung erscheinen:

---

[1]) *H. B. Vickery*, Journ. of biol. Chem. **58**, 495, 1922.

Bereits in früheren Publikationen (vgl. insbesondere *Fürth* und *Lieben*, II, S. 130ff.) hatten wir nachdrücklich auf die *störende Wirkung des Wassers auf die Voisenetsche Reaktion* hingewiesen und die Tat sache, daß *die absolute Intensität der Färbungsintensität mit zunehmender Salzsäurekonzentration zunimmt*, auf diesen wichtigen Umstand zurückgeführt.

Als eine bisher nicht beachtete Tatsache möchten wir aber nunmehr auf folgendes Faktum hinweisen: Wird mit einer *reinen* Tryptophanlösung die Voisenetreaktion ausgeführt und die intensiv violette Flüssigkeit allmählich mit Wasser verdünnt, so wird, wie bereits beschrieben, die Färbung immer schwächer werden, und zwar nicht etwa nur nach Maßgabe der effektiven fortschreitenden Verdünnung, sondern in viel schnellerem Tempo, derart, daß bereits nach einem mäßigen Wasserzusatz die Färbung nicht nur abgeschwächt, sondern vollständig verschwunden ist.

Wiederholen wir nun aber diesen Versuch mit einer Lösung nicht von freiem, sondern von *im Eiweißmolekül gebundenen* Tryptophan und versetzen wir nunmehr hinterher die schön dunkelviolette Lösung mit Wasser, so wird uns sogleich auffallen, daß das *Abblassen* der Färbung nunmehr *lange nicht so schnell fortschreitet wie beim Versuche mit einer reinen Tryptophanlösung*. Es sieht so aus, als wenn das vorhandene Eiweiß gewissermaßen als „Schutzkolloid" wirken und den *blauen Farbstoff vor der desintegrierenden Wirkung des Wasserzusatzes schützen würde.*

Denken wir nun auf Grund dieser Wahrnehmung logisch weiter und stellen wir uns folgende Frage: Wir hätten ein und dieselbe Tryptophanmenge, das eine Mal jedoch a) in freiem, das andere Mal b) in gebundenem Zustande, beidemal aber trocken. Wir setzen mit beiden Proben die Voisenetreaktion unter Anwendung hochkonzentrierter Salzsäure an: beide Proben werden dieselbe Färbungsintensität geben. Was wird nun aber geschehen, wenn wir beiderseits etwas Wasser hinzufügen und dadurch die Salzsäure verdünnen? Die Lösung des *freien Tryptophans* a) wird merklich abblassen. Bei der Lösung b) dagegen wird das Eiweiß als „Schutzkolloid" wirken und die Färbung vor dem Abblassen schützen. Die Folge wird sein, daß nunmehr a) heller erscheint als b). Wenn wir aber von diesem Umstande keine Kenntnis haben und etwa unter Anwendung von a) als Standard die relative Menge des Tryptophans in b) auszuwerten versuchen, *so werden wir irregeführt werden und die Menge des in der Eiweißbindung befindlichen Tryptophans überschätzen.* Denn der Wasserzusatz hat die Färbung des Standards in höherem Maße zum Abblassen gebracht als die Färbung der tryptophanhaltigen Proben.

Genau das gleiche wird aber geschehen, wenn wir von vornherein eine nur mäßig konzentrierte Salzsäure (etwa spezifisches Gewicht 1,15) verwenden: *Da der Wassergehalt derselben die Standardprobe in höherem Grade beeinträchtigt als die tryptophanhaltige Eiweißlösung, wird uns der Tryptophangehalt der Probe höher erscheinen als er tatsächlich ist.*

Arbeiten wir aber mit hochkonzentrierter Salzsäure (etwa einer solchen vom spezifischen Gewicht 1,19), so wird diese Irreführung unterbleiben.

Wenn wir also z. B. beim Fibrin, sobald wir die Reaktion mit der *schwächeren* Salzsäure angesetzt haben, etwa 5 Proz. Tryptophan finden, wenn wir mit *hochkonzentrierter* Salzsäure arbeiten, aber etwa nur 3 bis 4 Proz., und wenn wir den gleichen niederen Wert finden, wenn wir das Tryptophan vor Ausführung der Voisenetbestimmung durch *Verdauung* oder *Alkalihydrolyse* aus seiner kolloiden Bindung ausgeschaltet haben, so müssen wir uns schließlich für einen dieser beiden Werte entscheiden. Denn beide zugleich können ja nicht richtig sein! Da scheint es uns immerhin viel wahrscheinlicher, daß der hohe Tryptophanwert sozusagen eine *optische Täuschung* bedeutet, als daß das Tryptophan durch die Einwirkung der hochkonzentrierten Salzsäure oder bei seiner Ausschälung aus seiner kolloidalen Bindung durch die dauernde Einwirkung des kochenden Alkalis oder der Verdauung in so großem Umfange *zerstört* worden sei.

Wir sind also mit Hilfe der Voisenetmethode, welche allen anderen Methoden gegenüber den großen Vorzug der absoluten *Spezifizität* aufweist, zwar imstande, mit Bestimmtheit zu sagen, wieviel Tryptophan man durch Alkalispaltung oder Verdauung aus einem Protein *abspalten kann.* Wir können aber nicht mit voller Gewißheit die Möglichkeit leugnen, daß das native Protein noch mehr enthalten könnte und daß eben nur ein Teil des Tryptophans der Zerstörung entgeht, ein anderer Teil aber zugrunde geht. *Wahrscheinlicher* allerdings scheint uns die Annahme, daß dies nicht der Fall ist und daß es mit den niederen Zahlen seine Richtigkeit habe, während die höheren Zahlen durch eine (unvermeidliche und durch komplizierte physikalisch-chemische Momente bedingte) sozusagen „optische“ Täuschung bedingt seien.

Volle Gewißheit wird und kann uns der Natur der Sache gemäß erst dann werden, wenn wir die Voisenetmethode etwa durch eine fundamental verschiedene Methode werden kontrollieren können, die das Tryptophan auch in dem Verbande des Eiweißmoleküls zu fassen vermag. — Die Methode von *Folin-Looney* freilich kann uns diesen Aufschluß nicht geben, denn sie betrifft ja eben nur jenes Tryptophan, welches nach langdauernder Barytspaltung erhältlich ist. Auf das im Eiweiß gebundene Tryptophan dagegen ist sie nicht anwendbar. In bezug auf dieses durch Baryt abspaltbare Tryptophan besteht auch

heute ja kein Zweifel mehr, da in dieser Hinsicht die nach *Folin-Looney* und die nach unserer Voisenetmethode erhaltenen Werte durchaus miteinander übereinstimmen.

Jedoch noch ein anderer Umstand muß uns zu großer Vorsicht in der Verwertung der nach *Folin-Looney* gewonnenen Werte bei Proteinhydrolysaten mahnen.

Der eine[1]) von uns hat in einer vorangehenden Abhandlung[1]) ausführlich darauf hingewiesen, daß bei der Tyrosinbestimmung mit dem *Folin*schen Phenolreagens in Eiweißhydrolysaten *keine einfache Proportionalität zwischen der erzielten Färbungsintensität und dem reagierenden Substrate besteht*, wie dies übrigens schon früher von *Gortner* und *Holm*[2]) für die kolorimetrische Tyrosinbestimmung nach *Folin* und *Denis* dargetan worden ist.

Ein ganz analoger *Mangel an Proportionalität zwischen der erzielten Färbungsintensität und der Menge des reagierenden Substrats* machte sich nun auch bei der Tryptophanbestimmung in Proteinhydrolysaten bemerkbar. Z. B.

Wittepepton wurde unter genauester Einhaltung der Vorschriften von *Folin* und *Looney* verarbeitet. Nun heißt es (l. c., S. 430) in bezug auf das entsprechend vorbehandelte Hydrolysat:

„Transfer from 1 to 8 ccm to a centrifuge tube graduated at 10 ccm"... Wir haben nun verschiedene Proben angesetzt: a) mit 2 ccm, b) mit 4 ccm, c) mit 8 ccm des betreffenden Hydrolysates und haben die Bestimmung genau nach der Vorschrift der Autoren zu Ende geführt.

Wird die erzielte Färbungsintensität der Probe a) = 1 gesetzt, so ergab sich für:

b) statt 2,0 1,55
c) „ 4,0 2,01

Bei geringeren absoluten Tryptophanmengen scheint allerdings die Proportionalität eine bessere zu sein, doch erschwert dann wieder die allzu geringe Intensität der Färbung die Kolorimetrie.

IX. Empfohlener Vorgang zur Tryptophanbestimmung in Proteinen.

Die außerordentlich großen Schwierigkeiten, die sich einer exakten Tryptophanbestimmung in Proteinen entgegenstellen, gehen aus den vorstehenden Erörterungen zur Genüge hervor. Wenn wir im folgenden einen Vorgang empfehlen, so geschieht es im vollen Bewußtsein, daß es in diesem Falle darauf ankommt, wie eingangs gesagt, von ver-

[1]) *O. Fürth*, Kritisches und Experimentelles über die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen. *I. Warkany*, III. Die Bestimmung nach *Folin-Looney*. Diese Zeitschr. **146**, 268, 1924.

[2]) *R. A. Gortner* and *G. E. Holm*, The colorimetric estimation of Tyrosine by the Method of *Folin* and *Denis*. Journ. of the Amer. Chem. Soc. **42**, 1673, 1920.

schiedenen Übeln das kleinste zu wählen, und daß die so erzielten Resultate einer weiteren Verbesserung bedürftig und gewärtig sind.

Indem wir im ganzen bei dem von dem einen von uns gemeinsam mit *Lieben* und *Nobel* angegebenen Vorgange bleiben[1]) und es vorziehen, die Proteine schonend in Alkali zu lösen und direkt der Voisenetbestimmung zu unterziehen, anstatt sie erst der Barytspaltung zu unterwerfen, die Tryptophanfraktion sodann erst abzutrennen und zu kolorimetrieren, bemühen wir uns zunächst, eine Hauptfehlerquelle auszuschalten, nämlich den „*Wasserfehler*". Wir vergleichen nicht, wie wir dies früher getan haben, bei der *Voisenet*schen Reaktion den *Eiweißkörper* einerseits, eine *Tryptophan-Standardlösung* andererseits, denn dabei wird das in der angewandten Salzsäure, wofern wir nicht ganz konzentrierte Salzsäure verwenden, enthaltene Wasser, wie wir gesehen haben, zu einer „optischen Täuschung" führen und uns den Tryptophangehalt der Proteine größer erscheinen lassen, als es tatsächlich ist. Wir verwenden lieber eine *Lösung von Hammarstenschem Casein*, das wir mit einem Tryptophangehalt von 1,7 Proz. bewerten (effektive Maximalausbeute von *Hopkins* und *Cole* 1,5 Proz., von *Dakin* 1,7 Proz., Mittel aus den Bestimmungen von *Folin* und *Looney* 1,54 Proz., von *Fürth*, *Nobel* und *Lieben* 2,0 Proz., *Komm* und *Böhringer* 2,2 Proz.). Selbstverständlich ist auch dies nur ein weiterer Korrekturen gewärtiger Näherungswert. Das gilt natürlich nur dort, wo wir in einem *Protein* den Eiweißgehalt bestimmen wollen. (Dort, wo es sich um die Bestimmung von *freiem* Tryptophan handelt, muß man unbedingt auch eine Standardlösung von freiem Tryptophan verwenden, wenn man nicht wiederum einen „Wasserfehler" begehen will.)

Wird die Farbenreaktion *zweier Eiweißstoffe* als solcher, z. B. Wittepepton, direkt miteinander verglichen, so gelangt man zu einer bestimmten Relation, z. B.

$$\text{Wittepepton} : \text{Casein} = 4{,}2 : 1{,}7 = 2{,}47.$$

Annähernd dieselbe Relation (vgl. Versuche IIc und IVm) ergibt sich aber auch, wenn man die *Barythydrolysate* dieser Proteine miteinander vergleicht:

$$\text{Wittepepton} : \text{Casein} = 4{,}4 : 1{,}64 = 2{,}68.$$

Wir haben also keinen Anhaltspunkt dafür, vom „Wasserfehler" abgesehen, die Wirkung auxochromer oder hemmender Einflüsse hier allzu hoch zu veranschlagen.

Zur Tryptophanbestimmung in Proteinen empfehlen wir nun folgenden Vorgang:

---

[1]) *O. Fürth* und *Nobel*, diese Zeitschr. **109**, 103, 1920; *O. Fürth* und *Fr. Lieben*, ebendaselbst, S. 124.

Zur Bereitung einer Standardlösung verwenden wir 24 Stunden lang bei 80° getrocknetes *Casein nach Hammarsten*[1]) als einen relativ reinen, chemisch einheitlichen und leicht erhältlichen Eiweißkörper, der in bezug auf seinen Tryptophangehalt ausreichend studiert ist. Dasselbe wird in einer 30proz. Lösung von Kaliumhydroxyd (mit Alkohol gereinigt) zu 5 Proz. in der Kälte gelöst. Der Tryptophangehalt einer derartigen Lösung wird mit 0,085 Proz. bewertet (5 × 0,017 Proz.).

In ganz analoger Weise wird eine 5proz. Lösung des zu untersuchenden *Proteins* bereitet. Die meisten Proteine lösen sich bei mehrtägigem Stehen mit 30proz. Kalilauge in der Kälte. Sollte dies ausnahmsweise nicht der Fall sein, so führt kurzdauerndes Erwärmen, das nicht länger als eben nötig fortgesetzt wird, zum Ziele.

Die Ausführung der *Voisenetreaktion* erfolgt dann in gewohnter Weise: 2 ccm Standardcasein bzw. der Eiweißlösung werden in ein 25 ccm fassendes graduiertes Reagenzglas mit einer Pipette eingemessen und mit einem Tropfen 2,5proz. *Formaldehyd*lösung versetzt. Nach Umschütteln fügt man 15 ccm *reiner* konzentrierter Salzsäure (etwa spezifisches Gewicht 1,175) hinzu und mischt durch Umschütten in ein zweites Reagenzglas. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten fügt man 10 Tropfen einer 0,05proz. *Natriumnitrit*lösung hinzu, füllt mit der konzentrierten Salzsäure auf 20 ccm auf. Man überzeugt sich durch Schätzung mit freiem Auge, ob bei Mehrzusatz von einem Tropfen der Nitritlösung noch eine Verstärkung der Färbung eintritt, und fährt, wenn nötig, mit dem tropfenweisen Zusatz des Nitrits fort, bis man keine Zunahme der Färbung mehr wahrnimmt. Dann filtriert man die beiden gefärbten Lösungen (Standard-Caseinlösung und die zu bestimmende Proteinlösung) durch trockene gehärtete Filter (*Schleicher* und *Schüll*) zum Zwecke der Beseitigung der reichlich abgeschiedenen Kaliumchloridfällung und überträgt die beiden Flüssigkeiten in die Tröge des *Dubosqkolorimeters*. [Eigens angefertigte *Tröge* (vgl. *Fürth* und *Nobel*, diese Zeitschr. **109**, 112) sind unerläßlich, bei denen die zu kolorimetrierende Flüssigkeit ausschließlich mit Glas, keinesfalls aber mit Metall in Berührung kommt!] Man unterlasse es nicht, nachdem die kolorimetrischen Ablesungen ausgeführt worden sind, noch je einen Tropfen Nitritlösung der in den Trögen befindlichen Flüssigkeit hinzuzufügen und sich nach Umrühren mit einem Stäbchen davon zu überzeugen, ob die Färbungsintensität bereits wirklich eine maximale gewesen ist.

[1]) Es sei hier daran erinnert, daß das *Casein* beim Trocknen schon bei 80° einen nicht auf Wasserverlust zu beziehenden Gewichtsverlust erleidet (vgl. Abderhaldens Biochem. Handlex. 4, 104 und 113.

Wir lassen schließlich einige mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens ermittelte Zahlenwerte nebst einigen Vergleichsdaten folgen:

	Fürth u. *Dische* Proz.	*Fürth* u. *Lieben* Proz.	*Kiyotaki*[1]) Proz.	*Folin* u. *Looney* Proz.	*Komm* u. *Böhringer* Proz.	*Ide*[2]) Proz.	*May* u. *Rose* Proz.
Wittepepton . . .	4,0	5,3	—	3,03	5,3	—	—
Serumglobulin . .	3,1	4,4	4,0	2,28	—	—	—
Serumalbumin . .	1,2	1,3	1,4	—	—	—	—
Edestin	1,7	3,0?	—	1,40	—	—	—
Ovalbumin . . .	1,8	2,3—2,6	—	1,23	—	2,03	1,1
Gelatine	0	0	—	0	—	—	0

Wir hoffen durch weitere Untersuchungen die in bezug auf diese und andere Proteine in der Literatur vorliegenden widersprechenden Angaben ergänzen und berichtigen zu können.

Zusammenfassung.

1. Die *Loslösung des Tryptophans aus seinem Molekularverbande*, sei es durch weitgehende tryptische Verdauung, sei es durch langdauernde Alkalihydrolyse, nicht aber die *Zertrümmerung des Proteinmoleküls* als solche in größere Bruchstücke, wie sie sich bei der peptischen Verdauung oder bei kurzdauernder Alkalieinwirkung vollzieht, bewirkt ein Absinken des *kolorimetrischen Voisenettiters* (d. h. der relativen Intensität der Färbung, gemessen an der Färbungsintensität einer Standardlösung von reinem Tryptophan bei Ausführung der Voisenetreaktion unter Einhaltung genauer Versuchsbedingungen).

2. Dieses Absinken des kolorimetrischen Titers scheint nicht in erster Linie durch eine *Zerstörung* des Tryptophans als solche bedingt zu sein. Wenngleich das Tryptophan für die tryptische Verdauung und für die Alkalihydrolyse nicht völlig unempfindlich ist, so fanden wir dasselbe doch (in Übereinstimmung mit den Angaben von *Herzfeld*, *Miss Homer* und *Onslow*) insbesondere gegenüber der Barythydrolyse bei Gegenwart von Eiweißspaltungsprodukten sehr widerstandsfähig. Auch bei protrahierter Verdauungs- oder Alkalihydrolyse besteht im allgemeinen die Tendenz zur Einstellung des Tryptophantiters auf ein bestimmtes Niveau.

3. Das Absinken des kolorimetrischen Titers unter den obigen Bedingungen dürfte in erster Linie durch den „*Wasserfehler*" bedingt sein: die absolute Intensität der Voisenetfärbung hängt bei einer Lösung von *freiem* Tryptophan in hohem Grade von der Konzentration der angewandten Salzsäure ab, während *im Verbande des Eiweißmoleküls* befindliches Tryptophan in weiten Grenzen diesbezüglich von

[1]) *U. Kiyotaki*, diese Zeitschr. **134**, 322, 1922.
[2]) *T. Ide* (Kinderklinik, Wien), Zeitschr. f. ges. exper. Med. **24**, 190, 1921.

der Konzentration der angewandten Salzsäure unabhängig ist. Wird daher eine Eiweißlösung mit einer Standardlösung von freiem Tryptophan verglichen, so drückt der „Wasserfehler" die Intensität der Voisenetfärbung in der Standardprobe stärker herab als in der Proteinprobe, was eine *Überschätzung des Tryptophangehaltes der letzteren* zur Folge hat.

4. Zur Vermeidung dieses Wasserfehlers empfiehlt es sich, bei der *Tryptophanbestimmung in Proteinen* mit Hilfe der Voisenetreaktion sich keiner Standardlösungen von freiem Tryptophan zu bedienen, vielmehr die Lösung *eines Eiweißkörpers von bekanntem Tryptophan*gehalt als Standardlösung zu verwenden. Wir haben als solche das *Casein nach Hammarsten*, dessen Tryptophangehalt mit 1,7 Proz. veranschlagt wurde, in einer 5proz. Lösung in 30proz. Kalilauge verwendet. Die zu untersuchenden Eiweißkörper wurden direkt in ebensolcher Lauge bei Zimmertemperatur und nur, wenn nötig, durch kurzdauerndes Erwärmen zu 5 Proz. gelöst.

5. Eine solche direkte Bestimmung in alkalischer Lösung, wie sie auch schon früher von *Fürth* und *Lieben* empfohlen worden ist, ist der *Bestimmung des freien Tryptophans in alkalischem Hydrolysat* (protrahierte Barytspaltung), wie sie von *Folin* und *Looney* vorgeschlagen wird, vorzuziehen. Das auf der Anwendung des *Phenolreagens* basierende kolorimetrische Verfahren dieser Autoren erscheint für Eiweißhydrolysate schon insofern wenig geeignet, als hier keine einfache Proportionalität zwischen der Konzentration des reagierenden Substrats und der entwickelten Farbenintensität besteht und als, wie *Gortner* und *Holm* (l. c., S. 1692) gezeigt haben, Eiweißhydrolysate anscheinend außer Tyrosin und Tryptophan noch andere Bestandteile enthalten, die mit dem Phenolreagens blaue Färbungen erzeugen.

Zur Frage des Vorkommens, der autolytischen Neubildung sowie der physiologischen Bedeutung der Milchsäure in pflanzlichen Geweben.

Von

Rudolf Flury (Zürich).

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 2. Februar 1924.)

Der Umstand, daß gerade die Forschungen des letzten Dezenniums der Milchsäure sozusagen eine zentrale Stellung in den Problemen des Kohlehydratabbaues in tierischen Geweben zugewiesen haben, läßt eine Revision der Frage erwünscht erscheinen, welche Rolle denn eigentlich die Milchsäure im pflanzlichen Organismus spiele. Wir wissen längst, daß die Fähigkeit zu vitaler und postmortaler Milchsäurebildung nicht etwa ein Vorrecht der Muskelzelle bildet, sondern höchstwahrscheinlich zu den allgemeinen *Grundeigenschaften der tierischen Zellen* gehört, wenngleich das Ausmaß der Milchsäurebildung außerordentlich großen Verschiedenheiten unterliegt. Da drängt sich denn die Frage auf, ob denn nicht vielleicht gleiches für die pflanzlichen Zellen gelte und ob diese nicht auch, ähnlich den tierischen, befähigt seien, aus einer kohlehydratartigen Vorstufe, einem „Lactacidogen", Milchsäure zu produzieren. Die Frage erscheint um so mehr berechtigt, als die älteren Methoden des Nachweises und der Bestimmung der Milchsäure höchst mangelhaft waren und als kleine Milchsäuremengen mit Hilfe derselben schwerlich erkannt, geschweige denn bestimmt werden konnten. Daß die hier gemeinte Milchsäurebildung von dem altbekannten Vermögen vieler *Mikroorganismen*, Zuckerarten zu inaktiver Milchsäure zu *vergären*, grundverschieden ist, bedarf keiner besonderen Erörterung.

Die Frage einer allgemein physiologischen Bedeutung der Milchsäure in pflanzlichen Geweben ist seinerzeit von *Stoklasa*[1]) (Prag) aufgerollt

---

[1]) *J. Stoklase*, Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenkunde II, **18**, 86; Chem. Centralbl. **1905**, I, 37; Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **22**, 460, 1904; Chem. Centralbl. **1905**, I, 265; Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 303, 1907.

worden. Derselbe stieß bei seinen Versuchen zur Isolierung gärungserregender Enzyme aus dem Pflanzenorganismus in zymasehaltigen Fraktionen auf ein Enzym („Lactolase"), welches *Milchsäurebildung* hervorruft. Dieselbe soll sowohl bei normaler als auch bei anaerober Atmung vorkommen und eine der Fundamentalerscheinungen des Stoffwechsels bedeuten. Beim Studium der chemischen Bilanz der anaeroben Atmung wurde festgestellt, daß mehr von der vorhandenen Zuckerart zersetzt wurde, als der theoretischen Bildung von Alkohol und Kohlensäure entsprach, daß die Acidität der Lösung nach längerer Gärung anstieg, und daß diese Aciditätszunahme von Milchsäurebildung herrühre. *Stoklasa* hat weiterhin gefunden, daß bei der *mikroorganismenfreien anaeroben Atmung* von Zuckerrüben, Gurken, Kartoffeln und Erbsen außer den Hauptprodukten Alkohol und Kohlensäure eine gewisse Menge Milchsäure (durch Zinklactat identifiziert) entsteht. Aus Pflanzensäften gewonnene Rohenzyme bewirkten in Glucoselösungen bei Toluolzusatz neben alkoholischer Gärung auch das Auftreten von Milchsäure.

G. Muenck[1]) (im Rostocker pharmakologischen Institut) erhielt durch Extraktion zerkleinerter *Lupinensamen* mit physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von Toluol ein aus Stärke Milchsäure bildendes Ferment. Die säurebildende Kraft dieses Enzyms war eine sehr große. Das Enzym erwies sich befähigt, außer aus Glucose auch aus Galaktose, Maltose, Rohrzucker, Glykogen und Stärke Milchsäure zu bilden.

Außer diesen Angaben finden sich in der Literatur noch sporadische Gelegenheitsbeobachtungen über die Auffindung von Milchsäure in pflanzlichen Produkten und Drogen der verschiedensten Art. So im Sauerkraut und den sauren Gurken, im Heu, im Opium, Mutterkorn und in Tamarinden, in Morcheln und im Tausendgüldenkraut[2]). Diese Milchsäure ist ohne weiteres als gewöhnliche Gärungsmilchsäure bezeichnet worden, trotzdem meist angesichts der kleinen Mengen von einer exakten Unterscheidung derselben von Fleischmilchsäure gar keine Rede sein konnte.

Ich habe bei meinen eigenen Versuchen, anknüpfend an Befunde von *Fürth* und *Lieben*[3]), meine Aufmerksamkeit zunächst der *Hefe* zugewandt.

Die Genannten haben gelegentlich ihrer Untersuchungen über Milchsäurezerstörung durch Hefe gefunden: (Versuch 1) frische Preßhefe mit dem sechsfachen Volumen Leitungswasser nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur 0,12 Proz. Milchsäure. — (Versuch 2) Acetonhefe aus frischer Preßhefe nach *Buchners* Vorgange dargestellt: 0,15 Proz. Milchsäure. — (Versuch 3) wie Versuch 1: 0,23 Proz. Milchsäure. — (Versuch 9) ganz frische Hefe 0,06 Proz. Milchsäure.

Recht auffallend war eine einmalige Beobachtung, wo eine *Acetonhefensuspension*, mit Milchsäure versetzt, bei Luftdurchleitung (Versuch 6) anstatt der erwarteten Milchsäurezerstörung anscheinend eine erhebliche, weit außerhalb der Fehlergrenzen der Methode gelegene (Doppelbestimmungen!) autolytische *Milchsäureneubildung* ergeben hatte.

---

[1]) *G. Muenck*, Landwirtsch. Versuchsstat. **85**, 393, 1914; Chem. Centralbl. **1915**, I, 163.

[2]) Vgl. die Literaturangaben im Biochem. Handlexikon **2**, 1057, 1911.

[3]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, 145, 1922.

Anknüpfend an diese Beobachtung habe ich aus einer Portion frischer Hefe trockene Acetonhefe dargestellt (Vorgang: *Fürth-Lieben*, l. c., S. 153). Es wurde nunmehr ein Schüttelkolben mit 50 g frischer Hefe (enthaltend 13,2 g Trockensubstanz) und 470 ccm Leitungswasser, der andere Schüttelkolben mit 13,2 g trockener Acetonhefe und 500 ccm Leitungswasser beschickt, ein gleichmäßiger Luftstrom durchgeleitet und die entweichende Kohlensäure in drei Vorlagen mit 500, 200 und 100 ccm n/5 $Ba(OH)_2$ aufgefangen. Die Acetonhefe hatte nach siebenstündiger Schüttelung 0,38 g CO_2, die frische Hefe 1,34 g CO_2 entwickelt. Die Milchsäurebestimmung, nach Abschluß des Vorganges nach dem Verfahren von *Fürth* und *Lieben* (l. c.) durchgeführt, ergab in der Acetonhefe 0,20 Proz. Milchsäure (auf frische Hefe umgerechnet), in der frischen Hefenportion aber ein negatives Resultat.

Bei einem weiteren analogen Versuche wurde in jeden der beiden Schüttelkolben eine genau bekannte Menge Milchsäure (0,220 g in Form von Lithiumlactat) zugesetzt. (Die *Acetonhefe* war nach dem Vorgange von *Buchner, Rapp* und *Albert* bereitet worden.) Diesmal erwies sich die Acetonhefe in bezug auf die Atmungstätigkeit recht aktiv: CO_2-Produktion nach 8 Stunden Luftschüttelung 1,03 g CO_2 gegenüber 1,25 g der Parallelprobe mit frischer Hefe. Die Milchsäurebestimmung in der Acetonhefenprobe ergab nunmehr 1,194 g Milchsäure, d. i. 88 Proz. des Ausgangswertes, also eine geringe Abnahme, jedenfalls *keine Neubildung.*

Ein dritter analoger Versuch unter Zusatz einer größeren Milchsäuremenge (4,73 g) ergab nach siebenstündiger Luftschüttelung für die Acetonhefe 0,63 g CO_2-Produktion und 4,04 g Milchsäure, d. i. 86 Proz. des Anfangswertes; für die intakte Hefe 1,20 g CO_2-Produktion und 3,36 g Milchsäure, d. i. 76 Proz. des Anfangswertes, also wiederum eine mäßige Zerstörung. Es ist mir also *nicht* gelungen, den eingangs erwähnten Versuch einer *Milchsäurebildung durch Acetonhefe* zu reproduzieren.

Nun könnte es ja sein, daß gerade die Hefe für das Studium dieser Vorgänge wenig günstig wäre, da die „Zymase“ über die „Lactolase“ *Stoklasas* gerade hier allzusehr überwiegt. Ich habe daher in bezug auf die Fähigkeit pflanzlicher Gewebe, autolytisch Milchsäure zu bilden, einige Stichproben ausgeführt, und zwar wählte ich: a) *Spinat*, als Beispiel grüner Pflanzen; b) *Kartoffeln*, als Beispiel kräftig kohlehydratspeichernder Knollen; c) *Lupinen*, als kohlehydratspeichernder Samen, denen von *Muencke*, l. c., ein besonders kräftiges Milchsäurebildungsvermögen zugeschrieben worden ist.

Was die *Methode* betrifft, hielt ich mich an jenen Vorgang, den *Fürth* und *Lieben* (l. c., S. 149) für die Milchsäurebestimmung in Hefesuspensionen angewandt hatten:

Je 50 g des zerkleinerten Pflanzengewebes wurden untersucht, und zwar α) frisch, β) nach 100stündiger Autolyse bei 90° mit 250 ccm Leitungswasser unter Zusatz von Toluol (etwa 5 Proz.), γ) nach 100stündiger Autolyse bei 40° unter reichlichem Toluolzusatz in einer für Milchsäurebildung optimalen Puffermischung. Als solche wählte ich, dem Vorgange *Meyerhofs* entsprechend, eine 2,4proz. Lösung von Dinatriumphosphat.

Im übrigen befolgte ich genau den Vorgang von *Fürth* und *Lieben*: Die Suspension wurde nach Beendigung des Versuches mit *Ammonsulfat* gesättigt, ein aliquoter Teil durch ein trockenes, mit Kieselgur beschicktes Faltenfilter filtriert und nach Zusatz von $^1/_{10}$ Vol. 50proz. *Schwefelsäure* quantitativ mit *Amylalkohol* ausgeschüttelt (fünfmal); die Milchsäure wurde aus diesem portionenweise in 2proz. *Natriumcarbonatlösung* übergeführt. Die Na_2CO_3-Lösung, welche die gesamte Milchsäure aufgenommen hatte, wurde zur Vertreibung des Amylalkohols nach Zusatz von Dimethylamidoazobenzol mit Wasserdampf destilliert, schließlich der Milchsäurebestimmung nach *Fürth-Charnass* unterworfen.

Ich teile die Resultate: Gramm Milchsäure bezogen auf *1 kg Trockensubstanz*, tabellarisch mit:

	Frisch	Nach 100stündiger Autolyse	
		in Wasser	in Puffermischung
Spinat	1,2	1,7	1,7
Lupinen	0,5	0,9	1,4
Kartoffeln	0,5	0,8	0,8

Wie ersichtlich, sind die Mengen Milchsäure, um die es sich hier handelt, sehr gering. Es wird dies ohne weiteres ersichtlich, wenn man sich z. B. vergegenwärtigt, das *Laquer* in Froschmuskeln nach zweistündigem Verweilen bei 45° Milchsäurewerte von 0,34 bis 0,45 Proz., in 2proz. $NaHCO_3$-Lösung aber solche von 0,56 bis 0,80 Proz. erhalten hat. *O. Meyerhof* hat in obiger Puffermischung Werte von 0,8 bis 1,2 Proz. erzielt. Jedoch auch in anderen tierischen Organen ist eine ausgiebige autolytische Milchsäurebildung kaum je vermißt worden. Die angeführten Werte beziehen sich auf frische Muskeln und müssen, auf Trockensubstanz bezogen, aber mindestens vervierfacht werden.

Stoklasa hat nun freilich zuweilen weit höhere Werte gefunden: z. B. für Rüben 3,2 g, für Erbsen 2,4 g, für Gurken 8,2 g Milchsäure in 1000 g Trockensubstanz. Aber abgesehen davon, daß die Technik der Milchsäurebestimmung zur Zeit als *Stoklasa* seine Bestimmungen ausgeführt hatte, noch durchaus nicht so weit ausgebildet war, um kleine Milchsäuremengen auch nur einigermaßen richtig bestimmen zu können, sind vielfach Zweifel geltend gemacht worden, ob nicht diese Resultate durch Mitwirkung von Bakterien getrübt worden seien. (Vgl. diesbezüglich die kritischen Erörterungen von *Fürth*, Probleme der physiologischen und pathologischen Chemie, II, S. 323 ff., 1913.)

Wir sind auch heute noch nicht in der Lage, mit Bestimmtheit angeben zu können, ob derartige minimale Werte, wie sie bei obigen Analysen resultierten, wirklich auf Milchsäure und nicht etwa auf irgend eine andere Substanz zu beziehen seien, die in Spuren Aldehyd

oder eine andere bisulfitbindende Substanz liefert. Noch weniger aber können wir entscheiden, ob die kleinen Milchsäuremengen, falls sie wirklich vorhanden sind, „*physiologische*", also Fleischmilchsäure oder *inaktive Gärungsmilchsäure* seien. Selbstverständlich ist nur die erstere für das uns interessierende Problem von Bedeutung. Daß in kohlehydratreichen Pflanzenteilen sich unter Umständen (wie das ja in grobem Maße bei der Gärung des Sauerkrautes der Fall ist) unter der Mitwirkung von Gärungserregern Milchsäure bilden könne, bezweifeln wir natürlich nicht im geringsten. Die Überzeugung aber, daß ein „*Lactacidogen*", *analog wie in tierischen Zellen, auch in pflanzlichen Geweben eine physiologisch bedeutsame Rolle spiele, vermochten wir zum mindesten aus unseren Versuchen nicht zu gewinnen.*

Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung einiger Stichproben pflanzlicher Zellen (Hefe, Spinat, Lupinen, Kartoffeln), teils frisch, teils bei Toluolautolyse mit und ohne Zusatz von Phosphatpuffermischung, ergab sich kein sicherer Anhaltspunkt dafür, daß ein Analogon des „*Lactacidogens*" auch in pflanzlichen Geweben, ähnlich wie in tierischen, eine physiologisch bedeutsame Rolle spiele.

Beiträge zur Methodik der Mikroanalyse im Preglschen System.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

1. Über Mikrodumas.

Wie *Pregl* selbst in seinem Buche sagt[1]), ist die Regulierung des Luftstromes die einzige Schwierigkeit der Mikrodumasbestimmung. Wir haben diese Schwierigkeit auch selbst empfunden und konnten sie durch Anwendung des in Abb. 1 abgebildeten Hahnes beseitigen.

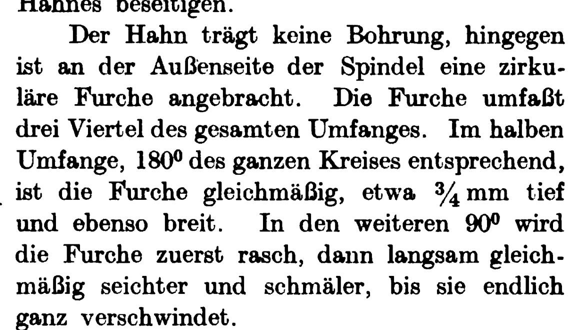
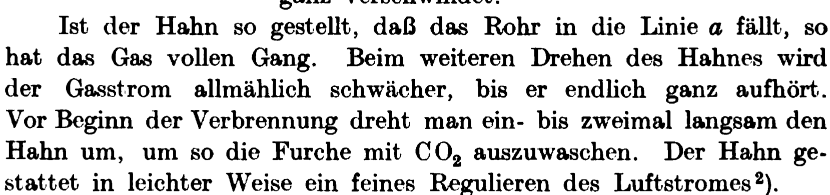


Abb. 1.

Der Hahn trägt keine Bohrung, hingegen ist an der Außenseite der Spindel eine zirkuläre Furche angebracht. Die Furche umfaßt drei Viertel des gesamten Umfanges. Im halben Umfange, 180° des ganzen Kreises entsprechend, ist die Furche gleichmäßig, etwa 3/4 mm tief und ebenso breit. In den weiteren 90° wird die Furche zuerst rasch, dann langsam gleichmäßig seichter und schmäler, bis sie endlich ganz verschwindet.



Ist der Hahn so gestellt, daß das Rohr in die Linie *a* fällt, so hat das Gas vollen Gang. Beim weiteren Drehen des Hahnes wird der Gasstrom allmählich schwächer, bis er endlich ganz aufhört. Vor Beginn der Verbrennung dreht man ein- bis zweimal langsam den Hahn um, um so die Furche mit CO_2 auszuwaschen. Der Hahn gestattet in leichter Weise ein feines Regulieren des Luftstromes[2]).

2. Pipettieren.

Bei Anwendung der *Pregl*schen Präzisionsauswaschpipette[1]) haben wir manche Unbequemlichkeit gefunden. Erstens muß die Flüssigkeit in jedem Falle über die Marke gesogen werden, und zwar ohne daß

---

[1]) *Fr. Pregl,* Die quantitative organische Mikroanalyse, II. Aufl., S. 109 und 117. J. Springer 1923.

[2]) Der Hahn kann von A. Dargatz, Hamburg I, Pferdemarkt 66, bezogen werden.

man dies mit dem Auge genauer kontrollieren könnte. Durch Ankleben an das Glas kann dies bei visköseren Flüssigkeiten einen Fehler bedingen. Weiterhin kann man die relativ weite obere Öffnung der Pipette nur schwer mit dem Finger genügend genau abschließen, um die Flüssigkeit genau bis zur Marke abzulassen. Drückt man den Finger an, um die Öffnung zu verschließen, so verringert man durch den eingepreßten Finger den Rauminhalt der Pipette, und die Flüssigkeit läuft zu weit aus. Besonders lästig wird das Arbeiten bei viskösen Flüssigkeiten, die nicht von selbst ablaufen.

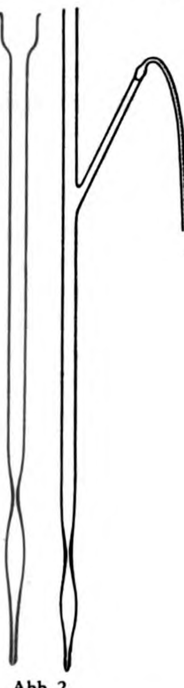


Abb. 2.

Seit längerer Zeit verwende ich mit gutem Erfolg eine Pipette, die von der *Pregl*schen im folgenden abweicht: 1. Das Rohr ist etwas schmäler und trägt oben keine Erweiterung; 2. die Pipette trägt ein dünnes Seitenrohr, das mit einem Fahrradventilgummischlauch montiert ist.

Bei der Pipettierung verschließt man die obere Öffnung des geraden Rohres mit dem befeuchteten Finger vollständig und saugt durch den Ventilschlauch unter Kontrolle des Auges bis zur Marke oder eine Spur höher, und läßt dann die Flüssigkeit ebenfalls unter Kontrolle des Auges bis zur Marke ab. Dann bläst man, ohne bei all den Manipulationen den Griff zu ändern, den Inhalt in das gewünschte Gefäß aus. Die Pipette wird dann aus einer Mikrospritzflasche nachgespült.

Hauptsächlich durch den so geringen Rauminhalt des Ventilschlauches ist dieses Arbeiten durchaus bequem und einfach. Die Leistung ist eine sehr genaue. Ich verwende Pipetten dieser Art mit sehr gutem Erfolg auch mit einem Rauminhalt von nicht mehr als 10 cmm.

3. Das Wägen geringer Niederschlagsmengen.

In Band 136 dieser Zeitschrift (S. 102) wurde ein Filterwägerohr beschrieben, das den durch die Feuchtigkeit der Luft bedingten Wägefehler weitgehend auszuschalten gestattet. Auf jeden Fall bedeutete dieses Röhrchen für uns einen sehr weitgehenden Fortschritt. Die ausgebreitetere Erfahrung zeigte aber, daß der mögliche Wägefehler bei diesen Röhrchen doch noch größer ist, wie dies zu Beginn gefunden und beschrieben wurde, und der durch den Wasserdampf bedingte Fehler noch nicht ganz ausgeschaltet sei. Auf Grund unserer Erfahrung können wir jetzt den Wägefehler bei gutem Schliff auf etwa 10- bis 20tausendstel Milligramm setzen.

Nachdem wir bei den Blutanalysen gezwungen waren, Wägungen sehr geringer Substanzmengen bis zur 6. Dezimale vorzunehmen, wurde ein Wägeröhrchen konstruiert, dessen Gewicht mit einer Schwankung von 0,000001 bis 0,000002 g reproduzierbar ist. Die Konstruktion ist aus der Abb. 3 verständlich. Der Schliff wurde weggelassen, nachdem wir Grund hatten zu vermuten, daß er beim Zu-

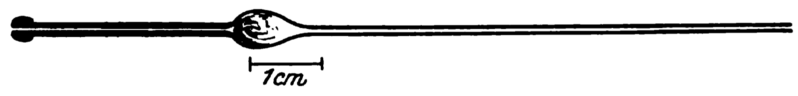


Abb. 3.

standekommen der Schwankungen wesentlich mitwirkte. Das ganze Röhrchen ist recht leicht gebaut. Am dicken Kapillarende wird das Vakuum angesetzt. Das Trocknen geschieht nach den an zitierter Stelle beschriebenen Prinzipien. Das offene Kapillarende wird durch einen kleinen aufgesetzten Korkstopfen abgeschlossen, in den vorher mit einer entsprechend dicken Nadel ein entsprechend dickes blindes Loch gebohrt wurde.

Über das an genannter Stelle beschriebene Trockenschränkchen sei hier noch so viel erwähnt, daß es sich bei dem ausgebreiteten Gebrauch zeigte, daß ein besonderer Thermoregulator nicht nötig sei und eine genügende Temperaturregulierung auch durch die direkte Einstellung der Flamme mit der Schraube des Dackelbrenners möglich ist.

Eine weitere wesentliche Verbesserung des Apparates wurde durch den Gebrauch von Metallhähnen erreicht, die fest am U-Rohr sitzen. Durch Weglassen der Glashähne wird der Apparat viel stabiler und dichter. In dieser Form wird das Kästchen auch für den Handel durch A. Dargatz, Hamburg, Pferdemarkt 66, angefertigt.

Über das Eindampfen von wässerigen Flüssigkeiten bei niedriger Temperatur im Vakuum.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das Eindampfen von wässerigen Flüssigkeiten bei niedriger Temperatur im Vakuum ist nach den Erfahrungen des Verfassers mit zwei Schwierigkeiten verbunden. Die erste liegt in der bekannten großen Kochträgheit des Wassers. Die zweite Schwierigkeit, die auf Grund der kinetischen Gastheorie gut verständlich ist, sei aus dem folgenden groben Beispiel beleuchtet: es sei ein Rezipient von 5 Liter Inhalt gegeben mit einer kleinen Menge des zu verdampfenden Wassers. Haben wir den Druck auf 15 mm erniedrigt, so verdampft Wasser und erhöht den Druck auf 16 mm (Dampfspannung des Wassers). Setzen wir nun den nicht ganz ungünstigen Fall, daß wir diesen 1-mm-Druck in einer halben Minute wieder wegpumpen können. Ist dies geschehen, so wiederholt sich das Spiel. Da aber zur Ersetzung dieses 1-mm-Druckes etwa 0,01 g Wasser ausreicht, so wird das Verdampfen von 1 g Wasser beinahe 4 Stunden erfordern.

Gibt man der zu verdampfenden Flüssigkeit eine genügend weite Oberfläche, so kann man auf das Kochen gut verzichten. Das Verdampfen an der Oberfläche ist bei niedrigen Drucken im mittelhohen Vakuum für unsere Zwecke intensiv genug. Die zweite Schwierigkeit kann in der Weise überwunden werden, daß man die Dämpfe nicht wegpumpt, sondern im Rezipienten selbst an einer weiten Oberfläche bindet.

Mit der freundlichen Mitwirkung der Firma *A. Dargatz* zu Hamburg haben wir auf Grund der genannten Überlegungen den in beiliegender Skizze wiedergegebenen Apparat konstruiert. Dieser besteht im wesentlichen aus einem doppelten Zylinder. Der innere ist der Rezipient, er dient zur Evakuierung. Der äußere Zylinder ist ein Kühlmantel, der mit Salz-Eis-Kältemischung aufgefüllt wird. Die zu verdampfende

Flüssigkeit wird in flachen Schalen (Kristallisierschalen) eingelegt. Zur Wärmezufuhr dient eine Rohrleitung, die in einem seichten, breiten

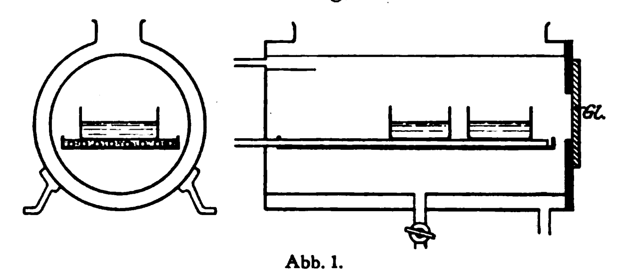


Abb. 1.

Becken liegt. Die leitende Verbindung zwischen Schale und Rohrsystem wird durch eingegossenes flüssiges Paraffin hergestellt.

Die Öffnung des Zylinders wird mit einer geschliffenen Glasplatte abgeschlossen (als Schmiere dient gewöhnliches Vaselin).

Ist der Kühlmantel aufgefüllt, der Apparat evakuiert, so beginnt ein rasches Verdampfen. Die Dämpfe kondensieren prompt an der gekühlten Zylinderwand, so daß das weitere Verdampfen ungehindert fortgehen kann. Dies bedingt, daß die zu verdampfende Flüssigkeit trotz starker Wärmezufuhr zum Teil bald erfriert, so daß die weitere Verdampfung trotz Wärmezufuhr praktisch bei 0^0 vor sich geht. Das Tempo des Verdampfens ist nun von der Menge der zugeführten Wärme abhängig.

Die Menge des dem Apparate entweichenden Wasserdampfes ist sehr gering, so daß man keinen weiteren Kühler zwischen Apparat und Pumpe einzuschalten braucht und das weggesogene Gas direkt chemisch getrocknet werden kann, falls dies die verwendete Pumpe (Öl- oder Quecksilberpumpe) erfordert. Sehr gute Dienste leistete uns beim Evakuieren die Quecksilberdampfstrahlpumpe, die auch keinen weiteren Schutz erfordert. Ihr Kühlwasser, noch weiter erwärmt, kann auch gut zur Erwärmung des Zylinders dienen.

Die Dimensionen unseres Modellapparates sind so gewählt, daß unsere Kristallisierschalen von 14 bis 7 ccm noch gut eingeführt werden können. In diesen kann gleichzeitig 1 Liter Flüssigkeit eingedampft werden. Für 2 Liter Flüssigkeit dient eine flache Eisenblechschale. Wir versehen unseren Apparat zur Wärmeisolierung auch noch mit einem Filzmantel.

Das Prinzip wird sich wahrscheinlich auch zum Anlegen von größeren Einrichtungen eignen. Bei diesen wird man an Stelle der Salz-Eis-Mischung einen Kühlapparat anschließen und den Kühlmantel mit Glycerin füllen.

Der Apparat wird für den Handel von A. Dargatz, Hamburg, Pferdemarkt 66, angefertigt.

Über das Verhalten der Blutlipoide unmittelbar nach Fettzufuhr bei normalen und zuckerkranken Menschen, mit und ohne Anwendung von Insulin.

Von

H. U. Hartmann.

(Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 3. Februar 1924.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Zerstreut in der Literatur finden wir Angaben über den Cholesterin- und Fettgehalt des Blutes beim gesunden Menschen und bei verschiedenen krankhaften Zuständen, besonders bei *Diabetes mellitus*. Die meisten Autoren fanden den Cholesterinspiegel bei Zuckerkranken erhöht, doch ist es schwer, die Resultate zu vergleichen, da die Methoden der Fett- und Cholesterinbestimmungen verschieden sind und doch wohl etwas verschiedene Werte ergeben dürften, um so mehr, als es sich zumeist um kolorimetrische Bestimmungen handelt, bei denen das subjektive Moment schwerer ganz auszuschalten ist als bei einer gravimetrischen oder volumetrischen Analyse. So fanden wir denn auch nur wenige Daten, die uns als Vergleichs- und Anhaltspunkte hätten dienen können.

Unter Blutfetten oder Lipoiden versteht die physiologische Chemie die Summe aus:

a) Cholesterin,
b) Cholesterinestern,
c) Neutralfett,
d) Phosphatiden und Fettsäuren.

Wir suchten in der vorliegenden Arbeit Auskunft über folgende Fragen zu erlangen:

1. Wie verhalten sich die Lipoide insgesamt und die Komponenten unter sich nach Genuß von Glucose oder nach einer fettreichen Mahlzeit

a) beim normalen Menschen?
b) bei leichtem Diabetes?
c) bei mittelschwerem Diabetes?
d) bei schwerem Diabetes mit Acidose?
e) bei einem Falle von Diabetes mit Xanthomatosis multiplex?

2. Werden die Lipoide, insgesamt oder einzelne Komponenten, beeinflußt durch *Insulin*?

3. Besteht eine Parallele zwischen Lipoidgehalt und Blutzuckerspiegel mit und ohne Anwendung von *Insulin*?

Abderhalden (1) erwähnt, daß das Cholesterin im Blute hauptsächlich als Fettsäureester enthalten ist. Fett und Fettsäureester finden sich im Serum, während Cholesterin und Lecithin in den Blutkörperchen lokalisiert sind. *Lichtwitz* (2) bespricht verschiedene Methoden der Cholesterinbestimmung und der Trennung des Cholesterins von den Cholesterinestern. Er gibt kolorimetrischen Bestimmungen den Vorzug, weil sie leichter und rascher auszuführen sind und für die klinischen Untersuchungen genügen. Das Verfahren von *Windaus*, welches der Methode von *Bang* zugrunde liegt, erklärt er für schwierig. Gehaltsangaben finden wir bei diesen Autoren nicht. *Hawk* (3) beschreibt die Methode von *Lichtenthäler*, welche eine Modifikation der Methode von *Autenrieth* und *Funk* ist für Cholesterinbestimmungen. Zur Ausführung der Analysen braucht man 2 ccm Blut oder Serum, und die Dosierung beruht auf Kolorimetrie. *Hawk* gibt in seiner Tabelle über Blutanalysen den Gehalt an Cholesterin in 100 ccm Blut beim Normalen zu 0,140 bis 0,180 g und den Gehalt an Fett zu 0,100 bis 0,700 g an. Beim schweren Diabetiker kann das Cholesterin auf 0,150 bis 0,300 g und das Fett von 3,0 bis 18,0 g steigen. Diese Fälle gehören wohl schon in die Kategorie der Lipämie, wo ein Cholesteringehalt von 0,5 bis 3,6 g und ein Fettgehalt von 3,0 bis 29,0 g beobachtet wurde. Der Autor bemerkt zu seiner Tabelle, daß einige Daten nur gestützt auf sehr wenige Analysen gegeben seien und eventuell als nicht ganz charakteristisch betrachtet werden können. Vom Diabetes heißt es: „there may also be an increase in fat and other lipoids“; bei Urämie erhöht sich der Gehalt an Cholesterin- und Phosphorverbindungen; nach fettreicher Mahlzeit kann der Blutfettgehalt beträchtlich steigen. *Bloor* (4) hat eine Methode der Cholesterinbestimmung angegeben, nach welcher die meisten der nachstehenden Autoren gearbeitet haben, aber man gebraucht für eine Dosierung 3 ccm Blut, und das Verfahren beruht auf Kolorimetrie. *Bloor* hat gefunden, daß Fettfütterung bei Tieren Erhöhung des Blutfettgehaltes schon nach einer Stunde bewirkt, daß der Cholesteringehalt dagegen kaum beeinflußt wird. *Shippers* (5) bestimmt den Neutralfettgehalt bei normalen Kindern zu 0,100 Proz. *Richter-Quittner* (6) kommt zum Schluß, daß die Blutkörperchen frei von Cholesterinestern sind und nur Cholesterin enthalten; sie bestätigt also die Befunde von *Abderhalden*.

Was nun speziell den Fett- und Cholesteringehalt des Blutes bei Diabetikern anbelangt, so ergaben die Analysen von *Chauffard*, *A. Guy Laroche* und *A. Grigaut* (7) bei Zuckerkranken normale und erhöhte Werte, wobei 0,15 bis 0,18 Proz. als Norm betrachtet ist. Auch diese Autoren stellen eine Zunahme des Blutfettgehaltes bei fettreicher Nahrung fest. *Majolo* (8) konstatierte bei Diabetikern immer eine Hypercholesterinämie; desgleichen *Malerba* (9), welcher Steigerungen des Cholesteringehaltes auf 0,225 bis 0,227 Proz. berechnete. Dasselbe beobachteten *Cowie*, *David Murray* und *Lynne A. Hoag* (10), sowie *Jedlička* (11), welcher aber sagt, der Cholesteringehalt stehe in keinem Verhältnis zum Blutzuckerspiegel oder zur Acidosis. *Blatherwick* (12) fand den Fettspiegel in leichten und mittelschweren Fällen von Diabetes (schwere kamen nicht zur Beobachtung) unabhängig von der Fettzufuhr, konstant.

Interessant sind die Angaben von *Blau, Nathan F.* und *Samuel Th. Nicholson* jr. (13), welche Fett-, Cholesterin- und Blutzuckerbestimmungen machten bei Diabetikern, die nach den diätetischen Vorschriften von *Allen-Joslin* behandelt wurden. Sie teilen danach die Diabetiker in drei Gruppen, durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

1. Abnahme der Hyperglykämie und Ansteigen des Fettgehaltes.
2. Fettgehalt steigt und fällt mit Zuckergehalt.
3. Blutfett bleibt hoch (1 Proz.), Zucker fällt.

Die Prognose für 3. ist schlecht.

Was Fälle von Diabetes mit multipler Xanthomatose anbelangt, so ist zu sagen, daß alle Autoren bei Xanthomatose *hohe Fett- und Cholesterinwerte* gefunden haben. *Ishimaru* (14) berechnete das Gesamtcholesterin bei Xanthomatosis multiplex und Xanthomatosis palpebrarum zu 0,255 bis 0,614 Proz.; er erwähnt aber, daß auch bei Normalen der Gehalt an Cholesterin sehr schwankend und namentlich bei Frauen im geschlechtstätigen Alter höher sei als bei Männern. Derselbe Autor (15) erzielte durch Verfüttern von Eigelb während dreier Monate bei Kaninchen und Hühnern experimentell eine Xanthomatose, wobei der Cholesteringehalt im Blut beim Kaninchen von 0,045 bis 0,123 Proz. auf 0,316 bis 1,222 Proz.(!) und beim Huhn von 0,140 bis 0,217 Proz. auf 0,300 bis 0,325 Proz. stieg. *Martin F. Engman* und *Richard S. Weiss* (16) veröffentlichen einen Fall von Xanthoma diabeticorum, der in extremis ins Krankenhaus eingeliefert wurde und auf energische Insulinbehandlung und unter strenger Diät sich in kurzer Zeit vollständig erholte, so daß er geheilt, zuckerfrei, entlassen werden konnte. Der Blutfettgehalt war zu Anfang 4,5 Proz. und der Cholesteringehalt 1,8 Proz.; diese Werte sanken rasch und das Cholesterin fiel auf 0,170 Proz. bei der Entlassung. Die Normen werden von diesen Autoren zu 0,3 bis 0,7 Proz. Fett und 0,3 Proz. Cholesterin angegeben. Ob nun der Rückgang des Fett- und Cholesteringehaltes dem Einfluß des Insulins zuzuschreiben ist, oder ob die diätetische Behandlung die Besserung des Fettstoffwechsels bewirkt hat, bleibt unentschieden.

Hier möge noch eine Arbeit von *Richard S. Weiss* und *Arthur L. Essermann* (17) Erwähnung finden, besonders weil sie zeigt, wie sehr Standardwerte für Cholesteringehalte im Blute fehlen, obschon sie, wie einleitend bemerkt, zu vergleichenden Untersuchungen sehr notwendig wären. Es handelt sich um Cholesterinbestimmungen bei Lues; das Blut wurde 2 bis 3 Stunden nach dem Essen entnommen, und die Autoren fanden sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit positivem Wassermann erhöhte Werte, jedoch bei Luetikern keine höheren als bei Normalen. Sie fragen sich nun, ob eventuell die Erhöhung mit der Nahrungsaufnahme im Zusammenhang stehen könne, und geben an, außer den Arbeiten von *Bloor* und *Kundson*, welche mit Hunden experimentiert hatten, keine Daten gefunden zu haben.

So sahen auch wir uns veranlaßt, vorerst Bestimmungen an Normalen zu machen, um so mehr, als von Bestimmungen nach der Methode *Bang* (18) nur zwei Arbeiten von *Shippers* zu finden waren, die uns weiter nicht dienen konnten.

Wir haben der Methode von *Bang* den Vorzug gegeben, weil es eine Mikromethode ist, die zur Dosierung nur 100 bis 130 mg Blut erfordert. Da wir Serienbestimmungen beabsichtigten, war es die

einzige in Betracht kommende Methode; zudem ermöglichte sie eine Trennung der vier Komponenten, welche das Gesamtfett ausmachen.

Der Gang der Untersuchung war folgender:

Von nachstehend beschriebenen Patienten nahmen wir Blutproben für Fett- und Zuckerbestimmungen:

a) nüchtern,

b) eine Stunde nach einer Mahlzeit, bestehend aus Glucose (20 bis 100 g), oder (Mehrzahl der Fälle) aus 50 g Butter und 20 g Hafermehl, mit etwas Wasser zu einem Brei gekocht[1]),

c) 2½ bis 3 Stunden nach dieser Mahlzeit,

d) 4 Stunden nach der Mahlzeit.

An einem zweiten Versuchstage gaben wir wieder Butter und Hafermehl, nachdem zuvor die Nüchternwerte bestimmt und 50 Einheiten *Insulin* (Iloglandol oder Iletin) subkutan injiziert worden waren. Die übrigen Bestimmungen erfolgten wieder 1, 2½ und 4 Stunden nach der Mahlzeit. Zum Teil wurde auch der Zucker im Urin nüchtern und nach der Mahlzeit bestimmt.

Fall 1a. Herr *F. S.*, 30 Jahr, klagt über Schmerzen in der Magengegend. Keine Abmagerung. Klinischer Befund negativ. Urin ohne Zucker und Eiweiß. Kann als Typus eines normalen Erwachsenen gelten. Bekommt am Versuchstage 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

Fall 1b. Herr *L.*, 58 Jahr, soll wegen Ösophagusdivertikel operiert werden; von der chirurgischen Klinik, weil Verdacht auf Diabetes besteht, zur Untersuchung überwiesen. Es konnte bei voller Kost und auch bei Belastung mit Kohlehydraten im Urin nie Zucker nachgewiesen werden. Patient bekommt am Versuchstage per os 100 g Glucose; Blutzucker und Blutlipoide werden hierauf bestimmt.

Fall 2. Frl. *O.* stammt aus einer Diabetikerfamilie: Mutter, Bruder und drei Schwestern sind zuckerkrank. Patientin ist 24 Jahr alt. Bei den Geschwistern ist der Diabetes zwischen dem 25. und 26. Jahre aufgetreten. Zucker im Urin negativ. Belastung mit 20 g Glucose und Berechnung des Blutzucker- und Blutfettspiegels.

Fall 3. Frl. *K.*, 40 Jahr, seit längerer Zeit zuckerkrank; nie rationell behandelt. In unserer Klinik vom 28. September bis 3. November. Beim Eintritt 4,1 Proz. Zucker im Urin. Aceton stark positiv. Diätetische Behandlung und drei Injektionen von je 10 Einheiten Iloglandol. Bei der Entlassung 0,6 Proz. Zucker im Urin bei kohlehydratarmer Kost; Aceton schwach positiv. Es handelt sich also um eine leichtere Form von Diabetes. Unsere Bestimmungen wurden gemacht, nachdem der Zucker auf 0,6 bis 0,8 Proz. gefallen war, was einer täglichen Ausscheidung von 8,8 g entspricht.

Fall 4. Frau *T.*, 49 Jahr, wegen Diabetes in unsere Klinik aufgenommen. Diätetische Behandlung. Harnzucker beim Eintritt 5,5 Proz. = 44 g pro die; Aceton stark positiv; Acetessigsäure negativ. Am Versuchstage 3,3 Proz. nüchtern und 3,5 Proz. Harnzucker nach der Probemahlzeit. Auf Iloglandol ging der Harnzucker am zweiten Versuchstage

---

[1]) Von der Darreichung von Fett allein als Mahlzeit mußten wir absehen, wegen der Unbekömmlichkeit und Schwierigkeit der ausschließlichen Butterzufuhr.

auf 1,2 Proz. = 10,8 g zurück. Wir rechnen diesen Fall zu den mittelschweren.

Fall 5. Herr *F.*, 57 Jahr. Diabetes seit etwa 10 Jahren, absolut vernachlässigt. Wird im Coma eingeliefert: Erbrechen, Acetongeruch, Sensorium benommen, große Atmung, Respiration 25, Puls um 90, Temperatur 36,6, Zucker 4,3 Proz., Aceton stark positiv, Acetessigsäure stark positiv. Erholt sich vollständig auf Insulin in folgenden Tagesdosen: 70 — 90 — 60 — 40 Einheiten. Vor dem ersten Versuch 2,1 Proz. Harnzucker; nach der Probemahlzeit 3,0 Proz. Vor dem zweiten Versuch 6,0 Proz. Harnzucker; hierauf Insulin und Probemahlzeit: Harnzucker 0,6 Proz. Gehört in die Kategorie der schweren Diabetiker.

Fall 6. Herr *F.*, 54 Jahr, wurde uns von der Dermatologischen Klinik zugewiesen als Diabetes mit multipler Xanthomatosis[1]). War diätetisch behandelt worden, worauf die Xanthome zurückgingen und jetzt nur noch in der Ellenbogenbeuge zu sehen sind. Wird ambulant in unserer Poliklinik mit Insulin behandelt. Der Urin enthielt am Versuchstage nüchtern 1,7 Proz. Zucker, nach der Probemahlzeit aus Fett und Hafermehl 1,8 Proz. Auf Insulin und gleiche Mahlzeit fiel der Zucker von 1,0 auf 0,1 Proz. Aceton immer negativ.

Dieser letzte Fall gab eigentlich die Anregung zu der vorliegenden Arbeit. Er erlaubt keinen Vergleich mit dem viel schwerer verlaufenden amerikanischen Fall von *M. F. Engmann* (S. 309). Tatsache ist, daß die multiple Xanthomatose schon auf reine Diätbehandlung zurückgeht, wie dies oft nachgewiesen werden konnte.

Wir geben nun nachstehend in Tabellenform die Resultate unserer Bestimmungen. Jeder Wert wurde in der Regel als Mittel aus drei Analysen berechnet. Abweichende Werte konnten trotz exaktesten Arbeitens nicht immer vermieden werden, ebensowenig wie Verluste, entstehend durch Springen der Proberöhrchen während der Manipulationen. Wir suchten diese Störungen dadurch zu verringern, daß wir immer, wie erwähnt, *drei Analysen* machten und zugleich Kontrollbestimmungen zu jeder Versuchsreihe ausführten. Im ganzen (die Vorversuche eingerechnet) liegen unserer Tabelle über 1000 Bestimmungen zugrunde.

	Cholesterin Proz.	Cholesterinester Proz.	Neutralfette Proz.	Phosphatide Proz.	Gesamtlipoide Proz.	Blutzucker Proz.
Fall 1a (Normal)						
Nüchtern	0,070	0,159	0,069	0,013	0,311	0,078
1h nach Fettmahlzeit .	0,052	0,178	0,096	0,015	0,341	0,088
$2^1/_2$h „ „ .	0,058	0,135	0,118	0,034	0,345	0,085
4h „ „ .	0,054	0,141	0,061	0,015	0,271	0,080
Fall 1b (Normal)						
Nüchtern	0,045	0,110	0,041	0,033	0,229	0,082
1h nach Glucose 100 g .	0,031	0,094	0,073	0,022	0,220	0,120
3 „ „ 100 g .	0,059	0,082	0,073	0,018	0,232	0,085

[1]) Herrn Prof. *Bloch* sprechen wir unseren Dank aus für die Zuweisung dieses interessanten Falles.

	Cholesterin Proz.	Cholesterinester Proz.	Neutralfett Proz.	Phosphatide Proz.	Gesamtlipoide Proz.	Blutzucker Proz.
Fall 2 (Normal)						
Nüchtern	0,055	0,048	0,027	0,014	0,144	0,109
1h nach Glucose 20 g	0,050	0,041	0,040	0,037	0,168	0,092
3 " " 20 g	0,051	0,057	0,031	0,018	0,157	0,089
Fall 3a (Leichter Diabetes)						
Nüchtern	0,029	0,112	0,036	—	0,177	0,074
1h nach Fettmahlzeit	0,041	0,098	0,044	0,019	0,202	0,094
2½h " "	0,076	0,123	0,032	0,036	0,267	0,086
4h " "	0,040	0,119	0,045	0,047	0,261	0,072
Fall 3b (Leichter Diabetes)						
Nüchtern	0,010	0,105	0,040	0,041	0,196	0,087
1h nach Iloglandol	0,008	0,116	0,040	0,037	0,201	0,080
1 " Fettmahlzeit	0,037	0,110	0,040	0,073	0,260	0,075
2½h " "	0,020	0,098	0,053	0,088	0,259	0,071
4h " "	0,034	0,123	0,038	0,039	0,234	0,069
Fall 4a (Mittelschwerer Diabetes)						
Nüchtern	0,023	0,086	0,051	0,048	0,208	0,196
1h nach Fettmahlzeit	0,014	0,091	0,071	0,041	0,217	0,226
2½h " "	0,011	9,075	0,088	0,027	0,201	0,194
4h " "	0,007	0,077	0,080	0,010	0,174	0,188
Fall 4b (Mittelschwerer Diabetes)						
Nüchtern	0,050	0,085	0,018	0,266	0,417	0,208
1h nach Iloglandol	0,039	0,077	0,015	0,210	0,341	0,140
1 " Fettmahlzeit	0,073	0,112	0,012	0,168	0,365	0,114
2½h " "	0,041	0,115	0,028	0,195	0,379	0,092
4h " "	0,055	0,060	0,019	0,235	0,369	0,076
Fall 5a (Schwerer Diabetes)						
Nüchtern	0,011	0,116	0,110	0,051	0,288	0,191
1h nach Fettmahlzeit	0,034	0,100	0,056	0,028	0,218	0,247
2½h " "	0,027	0,096	0,067	0,026	0,216	0,206
4h " "	0,021	0,114	0,046	0,033	0,214	0,184
Fall 5b (Schwerer Diabetes)						
Nüchtern	0,038	0,085	0,053	0,096	0,272	0,189
1h nach Iloglandol	0,040	0,077	0,057	0,084	0,258	0,176
1 " Fettmahlzeit	0,047	0,100	0,039	0,046	0,232	0,135
2½h " "	0,047	0,094	0,046	0,049	0,236	0,102
4h " "	0,049	0,093	0,061	0,020	0,223	0,092
Fall 6a (Diabetes + Xanthomatose)						
Nüchtern	0,035	0,118	0,306	0,038	0,497	0,175
1h nach Fettmahlzeit	0,052	0,101	0,335	0,036	0,524	0,203
2½h " "	0,027	0,094	0,300	0,020	0,441	0,155
4h " "	0,024	0,105	0,271	0,020	0,420	0,141
Fall 6b (Diabetes + Xanthomatose)						
Nüchtern	0,052	0,121	0,156	0,110	0,439	0,177
1h nach Iletin	0,040	0,128	0,146	0,065	0,379	0,123
1 " Fettmahlzeit	0,037	0,128	0,161	0,115	0,441	0,125
2½h " "	0,029	0,128	0,172	0,069	0,398	0,092
4h " "	0,020	0,144	0,172	0,061	0,397	0,103

Nachstehende graphische Tabellen erleichtern wesentlich den Überblick und lassen Abweichungen deutlicher erkennen. Wir ersehen daraus folgendes:

Der *Gesamtlipoidgehalt* schwankt zwischen 0,144 und 0,524 Proz. Er ist beim Diabetiker nicht ausgesprochen höher als beim Normalen, dagegen konstant hoch bei Xanthomatose. Hingegen übertrifft der Anstieg der Lipoide unmittelbar nach einer Fettmahlzeit bei Xanthomatose kaum denjenigen bei normalen Personen und Diabetikern mit und ohne Acidosis, weder prozentual noch absolut in augenfälliger Weise.

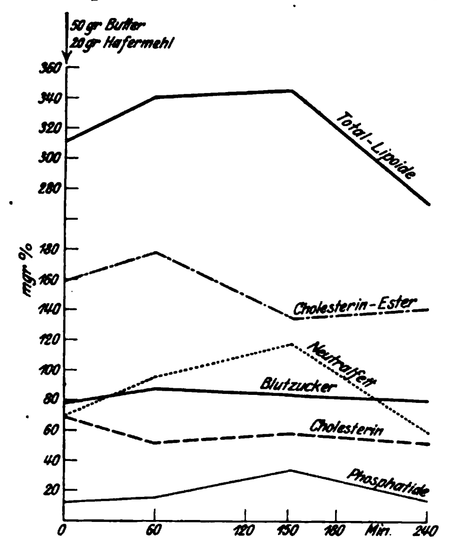


Abb. 1. *Fall 1a.* Blutlipoide und Blutzucker beim normalen Menschen nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

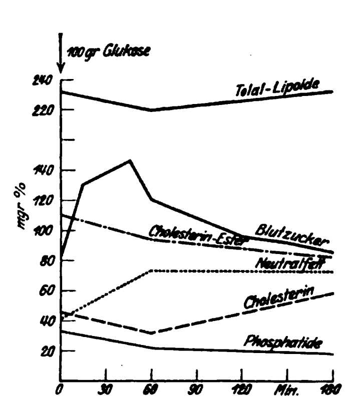


Abb. 2. *Fall 1b.* Blutlipoide und Blutzucker beim normalen Menschen nach Einnahme von 100 g Glucose.

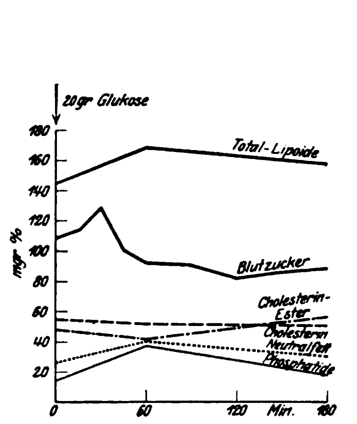


Abb. 3. *Fall 2.* Blutlipoide u. Blutzucker beim normalen Menschen nach Einnahme von 20 g Glucose.

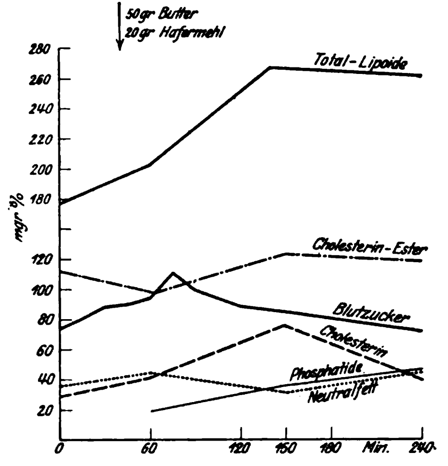


Abb. 4. *Fall 3a.* Blutlipoide und Blutzucker bei leichtem Diabetes nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

Das *Cholesterin* bewegt sich in den Grenzen von 0,007 bis 0,076 Proz.; die *Cholesterinester* schwanken zwischen 0,041 und 0,144 Proz. Die *Neutralfette* variieren von 0,012 zu 0,335 Proz., während der kleinste Wert für die *Phosphatide* zu 0,014 Proz., der größte zu 0,226 Proz. berechnet wurde. Die Schwankungen der Gesamtlipoide sowie der einzelnen Komponenten

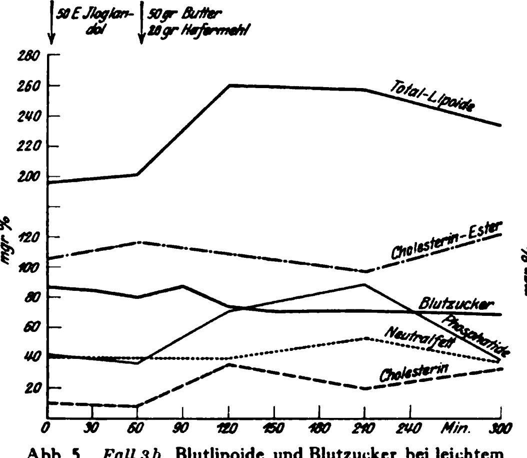


Abb. 5. *Fall 3b.* Blutlipoide und Blutzucker bei leichtem Diabetes nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl nach Injektion von 50 E Iloglandol.

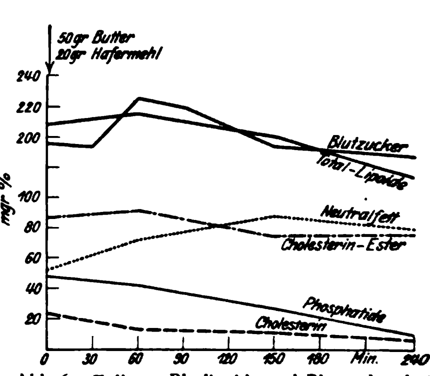


Abb. 6. *Fall 4a.* Blutlipoide und Blutzucker bei mittelschwerem Diabetes nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

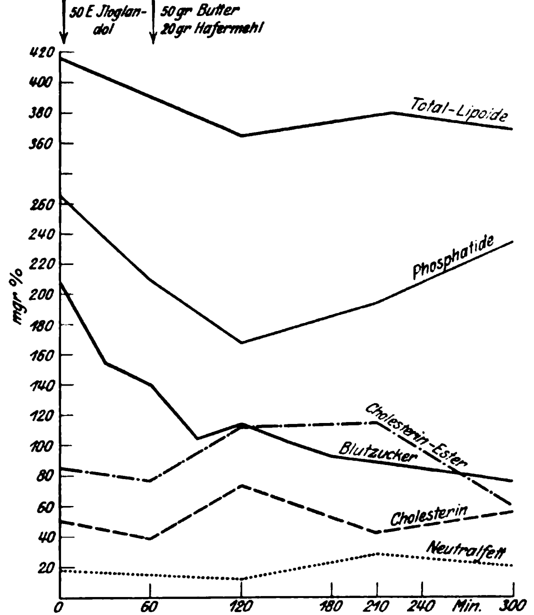


Abb. 7. *Fall 4b.* Blutlipoide und Blutzucker bei mittelschwerem Diabetes nach Einnahme von 50 g Butter und von 20 g Hafermehl nach Injektion von 50 E Iloglandol.

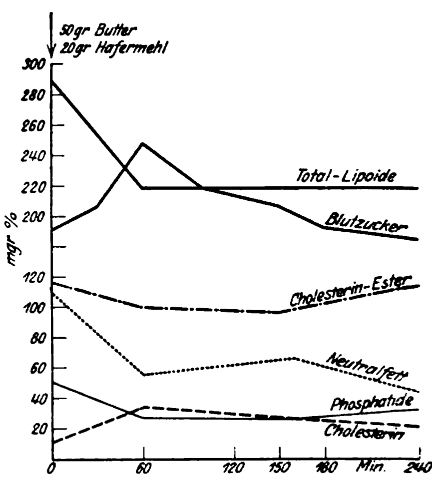


Abb. 8. *Fall 5a.* Blutlipoide und Blutzucker bei Diabetes mit Acidosis nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

sind somit beträchtlich groß, ohne daß ein Anhaltspunkt für das Zustandekommen der Unterschiede gefunden werden könnte.

Die Höhe des *Cholesterinspiegels* ist in keinem Zusammenhang mit der Schwere des Diabetes; sie ist auch beim normalen Menschen manchmal beträchtlich, so daß ein *kausaler* Zusammenhang mit der Zuckerkrankheit wohl nicht angenommen werden darf.

Es besteht im weiteren *keine Parallele* zwischen Blutzucker und Blutlipoiden.

Im Falle 4b stehen die Phosphatide sehr hoch und bei 6a steigen die Neutralfette bedeutend an. Wenn wir für die gewaltige Vermehrung der Phosphatide (die gleiche Person zeigte zwei Tage vorher Durchschnittswerte) keine Erklärung finden, so ist es dagegen naheliegend, das Verhalten der Neutralfette im Falle 6a mit der bestehenden allgemeinen Xanthomatose in Zusammenhang zu bringen: es liegt

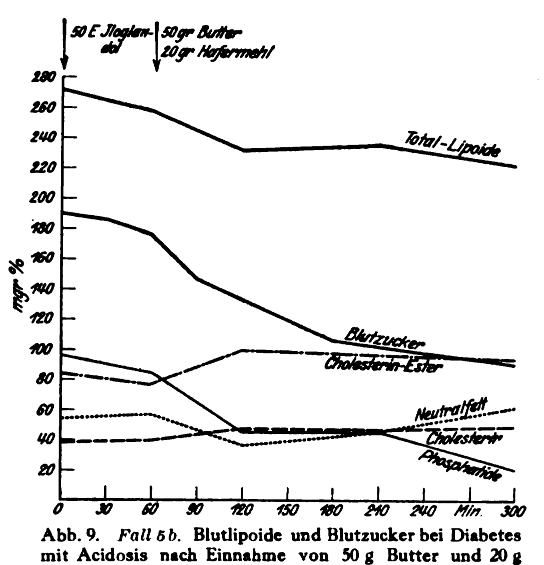


Abb. 9. *Fall 6b.* Blutlipoide und Blutzucker bei Diabetes mit Acidosis nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl nach Injektion von 50 E Iloglandol.

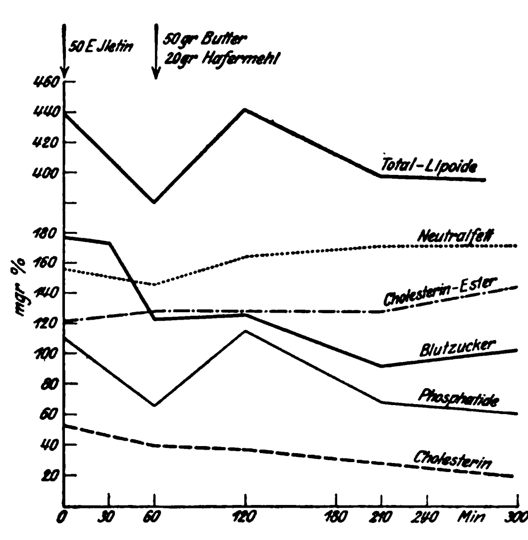


Abb. 11. *Fall 6b.* Blutlipoide und Blutzucker bei Diabetes mit Xanthomatose nach Einnahme von 20 g Butter und 20 g Hafermehl nach Injektion von 50 E Iletin.

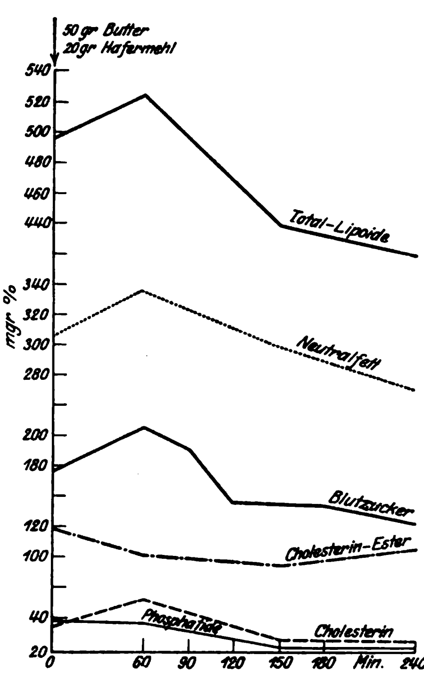


Abb. 10. *Fall 6a.* Blutlipoide und Blutzucker bei Diabetes mit Xanthomatose nach Einnahme von 50 g Butter und 20 g Hafermehl.

offenbar dem hohen Spiegel der Blutlipoide eine Störung des Fettstoffwechsels zugrunde.

Auffallend ist der praktisch kaum in Betracht kommende Einfluß des Insulins auf das Niveau der Blutlipoide. Dieser Umstand weist hin auf eine weitgehende Unabhängigkeit in der unmittelbaren Verarbeitung der Fette und Kohlehydrate im Organismus.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

1. Nach Einnahme von Glucose tritt keine Veränderung im Lipoidgehalt des Blutes auf, und zwar weder in einzelnen Komponenten, noch im Gesamtfett.

2. Nach Einnahme einer Mahlzeit von 50 g Butter und 20 g Hafermehl beim Normalen und bei Diabetikern jeden Grades (leichten, mittelschweren und acidotischen) steigt der Gesamtlipoidgehalt in den meisten Fällen nach der ersten Stunde etwas an, fällt aber nach vier Stunden wieder auf das Nüchternniveau; die einzelnen Komponenten verhalten sich dabei unregelmäßig, d. h. es tritt ein geringes Fallen oder Steigen bald der einen, bald der anderen Komponente auf.

3. In einem Falle von Diabetes ohne Acidose mit multipler Xanthomatose ergab sich ein auffallend hohes Nüchternniveau für die Gesamtlipoide. Der Hauptanteil dieser Steigerung entfällt auf die Neutralfette; auch die Cholesterinester zeigen gegenüber den Kontrollfällen eine bedeutende Erhöhung, während Cholesterin- und Phosphatidgehalt des Blutes noch in den Bereich der Kontrollen fallen.

4. Nach Einnahme derselben Mahlzeit, welcher eine Injektion von 50 Einheiten Insulin (Iloglandol oder Iletin) vorausging, verhalten sich die Lipoide und ihre Komponenten wie ohne Insulin.

5. Die Blutzuckerkurve ist unabhängig von der Fettkurve: sie steigt auf Butter und Hafermehl normaliter an, um dann langsam abzuklingen; auf Insulin erhalten wir die übliche, steil abfallende Kurve für den Blutzucker.

6. Auf Insulingaben beobachteten wir in drei von vier Fällen leichten Rückgang der Gesamtlipoide, ohne daß eine elektive Wirkung auf eine der Komponenten ersichtlich wäre; am ehesten kämen noch die Phosphatide in Betracht, die ziemlich regelmäßig auf Insulingabe abfielen, sich aber rasch wieder erholten.

Literatur.

1) *E. Abderhalden*, Lehrb. d. physiol. Chem. 1909. — 2) *L. Lichtwitz*, Klin. Chem. 1918. — 3) *Hawk*, Pract. physiol. chem. 1919. — 4) *Bloor*, Biochem. Zentralbl. 1917. — 5) *J. C. Schippers*, Zentralbl. f. inn. Med. **15**, 295, 1921. — 6) *Richter-Quittner*, ebendaselbst **14**, 457, 1920. — 7. *Chauffard, A. Guy Laroche* und *A. Grigaut*, ebendaselbst **16**, 263, 1921. — 8) *Majolo*,

Bonaventura, ebendaselbst **17**, 96, 1921. — 9) *G. Luigi Malerba*, ebendaselbst **19**, 278, 1921. — 10) *Cowie, David Murray* und *Lynne A. Hoag*, ebendaselbst **21**, 522, 1922. — 11) *Jaroslav Jedlička*, ebendaselbst **23**, 360, 1922. — 12) *N. R. Blatherwick*, ebendaselbst **22**, 115, 1922. — 13) *Blau, Nathan F.* and *Samuel Th. Nicholson* jr., ebendaselbst **17**, 40, 1921. — 14) *Ishimaru*, Acta dermatologica **1**, Fasc 3, p. 295, 1923. — 15) *Derselbe*, ebendaselbst **1**, Fasc. 4, p. 389, 1923. — 16) *Martin F. Engman* und *Richard S. Weiss*, Arch. of Dermatol. and Syphilol. **8**, No. 5, p. 625, 1923. — 17) *Richard S. Weiss* und *Arthur L. Essermann*, ebendaselbst **8**, No. 5, p. 639, 1923. — 18) *Ivar Bang*, Mikromethoder zur Blutuntersuchung 1922.

Über die Einwirkung von Bicarbonat und sekundärem Phosphat auf die Dissoziation des Calciums.

Von

H. Behrendt.

(Aus der Marburger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 5. Februar 1924.)

Klinische Erfahrungen weisen darauf hin, daß für den Dissoziationsgrad des Blutcalciums neben dem Bicarbonatgehalt auch die Phosphatkonzentration von Einfluß ist. Durch kürzlich von mir mitgeteilte Untersuchungen am Liquor cerebrospinalis[1]) wurde die Berechtigung dieser Anschauung experimentell sichergestellt. Um diese Beziehungen der Ca-Ionisation zum Phosphat auch zahlenmäßig ausdrücken zu können, wie es nach *Györgys*[2]) Vorschlag wünschenswert erschien, wurde das Ionenprodukt $[Ca^{\cdot\cdot}] . [HPO_4']$ nach der Methode von *Brinkman* und *van Dam*[3]) ermittelt. Gleichzeitig war mit dieser Methode eine Möglichkeit gegeben, die von *Rona* und *Takahashi*[4]) angegebene Konstante für den Quotienten $\frac{[Ca^{\cdot\cdot}] . [HCO_3']}{[H^{\cdot}]}$ nachzuprüfen.

Einige methodische Bemerkungen sind erforderlich. Da die Flüssigkeitsmengen nicht beschränkt waren, so wurde eine Makromethode benutzt. Uns stand das Nephelometer nach *Richards* zur Verfügung, wohl das älteste und auch unvollkommenste Modell, aber für unsere Zwecke völlig genügend. Die Feststellung der eben aufgetretenen leichtesten Trübung in einem der beiden etwa 50 ccm fassenden Gläschen gelingt mit diesem Apparat absolut sicher, und nur hierauf kam es uns an. Für quantitative Messungen ist er natürlich nicht verwertbar. Wie *Brinkman* und *van Dam* betonen, muß man beim Arbeiten mit reinen Salzlösungen das Auftreten von Übersättigungserscheinungen vermeiden. Dies geschah nach ihren Angaben dadurch, daß die betreffenden geringen Mengen des hinzuzufügenden Salzes nicht aus der Pipette zu dem Gros der Flüssigkeit hinzugefügt, sondern zuerst in ein Kölbchen getan und auf dem Wasserbade eingedampft wurden. Danach erfolgte das Hineingeben der Hauptflüssigkeitsmenge in denselben Kolben und nach gründlicher Durchmischung die Umfüllung in die Nephelometergefäße. Oder aber man gibt die zuzusetzende Salzmenge aus einer Mikrobürette direkt zu der Calciumlösung und läßt unter Paraffinabschluß

---

[1]) Diese Zeitschr. 144, 72, 1924.

[2]) Jahrb. f. Kinderh. 99, 1, 1922.

[3]) Kon. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam; Proceedings 22, Nr. 7, 1920.

[4]) Diese Zeitschr. 49, 370, 1913.

12 bis 14 Stunden stehen. Auch dann wird Übersättigung fast stets vermieden. Letzteres Vorgehen ist stets beim Arbeiten mit Bicarbonat notwendig, da man beim Eindampfen Carbonat erhält. Die Konzentration der Zusatzflüssigkeit wurde so stark gewählt, daß nie mehr als 1,5 ccm bis zum Auftreten der Trübung nötig waren, die dadurch bedingte Verdünnung also vernachlässigt werden durfte. Sämtliche benutzten Lösungen wurden CO_2-frei hergestellt und aufbewahrt, nur das $[HCO_3^{\cdot}]$ wurde in Form eines Bicarbonat-Kohlensäuregemisches verwendet. Während des nur wenige Minuten dauernden Versuches mußten die Flüssigkeiten ungeschützt bleiben. Die p_H-Messung erfolgte kolorimetrisch nach *Michaelis*.

In den ersten Versuchen wiederholten wir zur Kontrolle unserer Methode und unseres Arbeitens die zuerst von *Brinkman* und *van Dam* ausgeführte Feststellung des Löslichkeitsproduktes von $[Ca^{++}]$ und $[C_2O_4'']$. Zu 100 ccm einer m/100 Ammoniumoxalatlösung mußten bis zum Erscheinen der Trübung 0,06 ccm einer 9,49 Millimol $[Ca^{++}]$ enthaltenden $CaCl_2$-Lösung hinzugesetzt werden. Das Ionenprodukt in Millimol pro Liter beträgt also 0,057. In Tabelle I sind vier solche Versuche aufgeführt. *Brinkman* und *van Dam* geben 0,052 bis 0,056 als Wert für das Ionenprodukt an, also fast übereinstimmende Befunde.

Tabelle I.

Nr.	Konzentration der $CaCl_2$-Lösung	End-p_H	Verbrauchte Mengen m/100 Ammoniumoxalat ccm	Gehalt des Systems an $[Ca^{\cdot\cdot}]$	$[C_2O_4'']$	Ionenprodukt
1	Etwa m/100 = 9,5 Millimol Ca i. L.	5,9	0,03	9,5 Millimol i. L.	0,006	0,057
2	„ m/200 = 4,75 „ Ca i. L.	5,7	0,06	4,75 „ i. L.	0,012	0,057
3	„ m/500 = 1,90 „ Ca i. L.	5,35	0,15	1,9 „ i. L.	0,03	0,057
4	„ m/1000 = 0,95 „ Ca i. L.	5,1	0,4	0,95 „ i. L.	0,08	0,056
			auf je 50 ccm der $CaCl_2$-Lösung			

In analogem Vorgehen wurde das Verhalten von sekundärem Phosphat einer Calciumchloridlösung gegenüber geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß man beim Eindampfen des Phosphats sehr vorsichtig sein und ein Überhitzen vermeiden muß, denn sonst bildet sich unlösliches Pyrophosphat und täuscht schon sehr früh Trübungen vor. Ferner mißlangen die Versuche stets, wenn zu einer eingedampften kleinen $CaCl_2$-Menge das Phosphat in etwa m/100 Konzentration zugesetzt wurde. Nur bei umgekehrtem Vorgehen, also Zusatz einer m/100 $CaCl_2$-Lösung zu kleinen eingedampften Phosphatmengen wurde Konstanz erzielt. Den Grund für diese Beobachtung vermögen wir nicht anzugeben. Das Ergebnis der einwandfrei verlaufenen Versuche wird durch die Tabelle II dargestellt. Man sieht, um wieviel größer das Löslichkeitsprodukt zwischen $[Ca^{++}]$ und $[HPO_4'']$ ist als jenes von $[Ca^{++}]$ und $[C_2O_4'']$. Gleichzeitig erkennt man auch aus diesen

Versuchen, daß die verbrauchten Phosphatmengen in umgekehrtem Verhältnis zu den verwendeten $CaCl_2$-Konzentrationen stehen, die also praktisch als völlig dissoziiert gelten können.

Tabelle II.

Nr.	$CaCl_2$-Lösung ($p_H = 7{,}5$)	End-p_H	Zugesetzte Menge der Phosphatlösung*) ccm	Gehalt des Systems an $[Ca^{\cdot\cdot}]$	Gehalt des Systems an $[HPO_4^{\cdot\cdot}]$	Ionenprodukt
5	9,25 Millimol i. L.	7,5	0,16	9,25 Millimol i. L.	0,039	0,361
6	4,63 „ i. L.		0,3	4,63 „ i. L.	0,074	0,343
7	3,08 „ i. L.		0,47	3,08 „ i. L.	0,116	0,357
8	1,85 „ i. L.		0,8	1,85 „ i. L.	0,197	0,364
9	0,93 „ i. L.		1,6	0,93 „ i. L.	0,39	0,362
			auf je 50 ccm der $CaCl_2$-Lösung			

*) Analyse: 14,6 Millimol HPO_4 i. L., d. i. 12,3 Millimol $[HPO_4'']$ bei $p_H = 7{,}5$.

Endlich wurden analoge Versuche angestellt zur Ermittlung des Löslichkeitsproduktes zwischen $[Ca^{++}]$ und $[HCO_3']$, indem zu einer analysierten Calciumchloridlösung steigende Mengen eines Carbonatgemisches zugesetzt wurden, das durch Zusatz von Salzsäure zu einer Lösung von reinstem Bicarbonat hergestellt war. Sein Gehalt an $[HCO_3']$ wurde durch Titration gegen Methylorange festgestellt. Da ein Eindampfen des Carbonatgemisches nicht angängig ist, so müssen zur Vermeidung der sehr leicht auftretenden Übersättigung die Ca-Lösungen mit dem Carbonatzusatz mindestens 12 Stunden, am besten 24 Stunden stehen. Und auch dann erkennt man noch mitunter an dem viel zu späten und plötzlichen Eintritt ungewöhnlich starker Trübungen, daß eine Übersättigung vorlag. Ist das nicht der Fall, so nimmt die Trübung ganz allmählich in den Lösungen mit steigendem Carbonatgehalt zu. Die Tabelle III zeigt, daß recht große Mengen Bicarbonat erforderlich sind, um das Calciumsalz zu entionisieren. Im Vergleich zu Phosphat-Calcium ist das Löslichkeitsprodukt des Bicarbonat-Calciums etwa 40mal so groß.

Tabelle III.

Nr.	$CaCl_2$-Lösung	End-p_H	Zugefügte Mengen $[HCO_3']$ ccm	Gehalt des Systems an $[Ca^{\cdot\cdot}]$	Gehalt des Systems an $[HCO_3']$	Ionenprodukt
10	Etwa m/100 = 10,2 Millimol i. L.	7,45	0,2 v. 0,29 mol. Lsg.	10,2 Millimol i. L.	1,16	11,83
11	„ m/100 = 10,4 „ i. L.	7,4	0,2 v. 0,29 „ Lsg.	10,4 „ i. L.	1,16	12,06
12	„ m/100 = 10,4 „ i. L.	7,45	0,2 v. 0,29 „ Lsg.	10,4 „ i. L.	1,16	12,06
13	„ m/100 = 10,5 „ i. L.	7,5	0,2 v. 0,29 „ Lsg.	10,5 „ i. L.	1,20	12,60
14	„ m/500 = 2,8 „ i. L.	7,6	0,9 v. 0,31 „ Lsg.	2,8 „ i. L.	5,58	15,60

Die Kenntnis des Löslichkeitsproduktes zwischen $[Ca^{++}]$ und $[HCO_3']$ ermöglicht auf einem neuen Wege die Ermittlung der Konstanten, die *Rona* und *Takahashi* für die Beziehungen zwischen Calciumdissoziation, Bicarbonat- und H-Ionenkonzentration festgelegt und formelmäßig ausgedrückt haben,

$$[Ca^{++}] = k \cdot \frac{[H^+]}{[HCO_3']} \cdot \tag{1}$$

Schreiben wir diese Formel

$$k_1 = \frac{[Ca^{++}] \, . \, [HCO_3']}{[H^+]}, \tag{2}$$

so ist im Zähler das von uns ermittelte Ionenprodukt und im Nenner die $[H^+]$ der Versuchsanordnung bekannt. Wir können also aus jedem der im vorigen Abschnitt aufgeführten Versuche über das Löslichkeitsprodukt von $[Ca^{++}]$ und $[HCO_3']$ die Konstante für die *Rona*-Formel berechnen. Das ist geschehen und ergibt die in Tabelle IV stehenden Werte für k_1. Der Mittelwert aus den fünf Versuchen ergibt 367,8, *Rona* gibt 340 an. Die Übereinstimmung ist also vollständig befriedigend.

Tabelle IV.

Nr.	In Molen pro Liter			k_1
	$[Ca^{..}]$	$[HCO_3']$	$[H^{.}]$	
10	$102 . 10^{-4}$	$116 . 10^{-5}$	$3{,}54 . 10^{-8}$	334,2
11	$104 . 10^{-4}$	$116 . 10^{-5}$	$3{,}98 . 10^{-8}$	303,1
12	$104 . 10^{-4}$	$116 . 10^{-5}$	$3{,}54 . 10^{-8}$	340,8
13	$105 . 10^{-4}$	$12 . 10^{-4}$	$3{,}16 . 10^{-8}$	398,7
14	$208 . 10^{-5}$	$558 . 10^{-5}$	$2{,}51 . 10^{-8}$	462,4
			im Mittel:	367,8

Die entsprechende Ableitung für Phosphat ergibt:

$$[Ca^{++}] = k_2 \cdot \frac{[H^+]}{[HPO_4'']} \tag{3}$$

oder

$$k_2 = \frac{[Ca^{..}] \, . \, HPO_4'']}{[H^{.}]} \, . \tag{4}$$

In dieser Gleichung ist $[Ca^{..}].[HPO_4'']$ nichts anderes als das uns aus der Tabelle II bekannte Ionenprodukt, $[H^{.}]$ der betreffenden Versuchsanordnung ist ebenfalls bekannt, so daß k_2 aus diesen gegebenen Größen für jeden einzelnen der Versuche ohne weiteres zu berechnen ist. In Tabelle V sind die auf diese Weise aus 11 Versuchen abgeleiteten Werte für k_2 angegeben. Der Mittelwert für k_2 beläuft sich auf 11,19. Berücksichtigt man dagegen nicht $[HPO_4'']$, sondern die analytisch ermittelte Gesamtphosphatkonzentration (Spalte 4), so weichen mit wachsenden p_H-Differenzen die Zahlen immer mehr voneinander ab und man gelangt zu keiner Konstanten (Spalte 7). Daraus ist zu schließen, daß nur das sekundäre Phosphat für die beobachtete Entionisierung des Calciums verantwortlich zu machen ist.

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7
	In Molen pro Liter					
Nr.	$[Ca^{··}]$	$[HPO_4'']$	$[HPO_4''] + [H_2PO_4']$	$[H^·]$	k_2	(k_2)
5	$925 \cdot 10^{-5}$	$39 \cdot 10^{-6}$	$47 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**11,89**	13,73
6	$463 \cdot 10^{-5}$	$74 \cdot 10^{-6}$	$88 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**10,84**	12,88
7	$308 \cdot 10^{-5}$	$116 \cdot 10^{-6}$	$137 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**11,30**	13,35
8	$185 \cdot 10^{-5}$	$197 \cdot 10^{-6}$	$234 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**11,53**	13,67
9	$93 \cdot 10^{-5}$	$39 \cdot 10^{-5}$	$467 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**11,47**	13,74
11	$12 \cdot 10^{-3}$	$32 \cdot 10^{-6}$	$38 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**12,15**	14,43
12	$6 \cdot 10^{-3}$	$72 \cdot 10^{-6}$	$86 \cdot 10^{-6}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**13,67**	16,33
14	$12 \cdot 10^{-4}$	$28 \cdot 10^{-5}$	$33.6 \cdot 10^{-5}$	$3.16 \cdot 10^{-8}$	**10,63**	12,75
15	$106 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-6}$	$2.51 \cdot 10^{-8}$	**8,08**	9,80
16	$95 \cdot 10^{-4}$	$37 \cdot 10^{-5}$	$84 \cdot 10^{-5}$	$3.16 \cdot 10^{-7}$	**11,11**	25,25
17	$95 \cdot 10^{-4}$	$89 \cdot 10^{-6}$	$125 \cdot 10^{-6}$	$7.94 \cdot 10^{-8}$	**10,95**	14,95
				im Mittel:	**11,19**	

Wir wollen nun im folgenden die *Rona*-Formel und die soeben entwickelte entsprechende Formel für sekundäres Phosphat kombinieren, um dadurch die Veränderung der Ca-Ionisation unter dem gleichzeitigen Einwirken von HCO_3- und HPO_4-Ionen festlegen zu können. Durch Multiplikation der Gleichungen (1) und (3) entsteht die Gleichung

$$[Ca^{··}]^2 = \frac{k_1 \cdot [H^·] \cdot k_2 \cdot [H^·]}{[HCO_3'] \cdot [HPO_4'']}. \qquad (5)$$

Nach Einsetzen der entsprechenden Werte für k_1 und k_2 gelangt man zu den Formeln:

$$[Ca^{··}]^2 = \frac{340 \cdot 11{,}19 \cdot [H^·]^2}{[HCO_3'] \cdot [HPO_4'']}, \quad [Ca^{··}] = \frac{61{,}68 \cdot [H^·]}{\sqrt{[HCO_3'] \cdot [HPO_4'']}}. \qquad (6)$$

Zusammenfassung.

1. Es wird nach dem Verfahren von ***Brinkman*** und ***van Dam*** das Ionenprodukt $[Ca^{++}] \cdot [C_2O_4'']$ gemessen und der Wert von 0,056 bis 0,057 bestätigt.

2. Nach dem entsprechenden Verfahren mit Zufügung des Bicarbonations zu einer Kalklösung von bekanntem Gehalt und bei bekannter $[H^·]$ wird der Quotient $\frac{[Ca^{++}] \cdot [HCO_3']}{[H^+]} = 367{,}8$ gefunden, womit der von ***Rona*** und ***Takahashi*** auf chemisch-analytischem Wege ermittelte Wert bestätigt wird.

3. Die Anwendung des gleichen Prinzips ergibt für den Quotienten $\frac{[Ca^{++}] \cdot [HPO_4'']}{[H^·]}$ den Wert 11,19.

4. Die Berücksichtigung der Phosphationen in einer bicarbonathaltigen Calciumlösung führt unter Anwendung der oben ermittelten Quotienten zur Gleichung

$$[Ca^{··}] = \frac{61{,}68 \cdot [H^·]}{\sqrt{[HCO_3'] \cdot [HPO_4'']}}.$$

Beitrag zur kolorimetrischen Eisenbestimmung.

Von

D. v. Deseö.

(Mitteilung aus dem physiologischen Institut
der k. ungarischen tierärztlichen Hochschule, Budapest.)

(Eingegangen am 6. Februar 1924.)

Bei der Ausführung von Eisenbestimmungen an pigmentierten Knochen, die ich zur näheren Untersuchung erhielt, bediente ich mich des Rhodanverfahrens in der Form, wie sie von *W. Autenrieth* und *A. Funk* (1) zur Eisenbestimmung im Blute angegeben wurde. Hierbei erhielt ich in dem mit 1,8proz. HCl angefertigten Auszuge des Knochens:

in 1,5 ccm der Lösung bei	n/2	HCl-Konzentration	16,7 $^1/_{1000}$	mg Fe
„ 1,5 „ „ „ „	n/1	„	16,7 $^1/_{1000}$	„ „
„ 3 „ „ „ „	n/2	„	25,2 $^1/_{1000}$	„ „
„ 3 „ „ „ „	n/1	„	33,7 $^1/_{1000}$	„ „

wobei natürlich die untersuchten Mengen von 1,5 bzw. 3 ccm jedesmal auf 6 ccm aufgefüllt wurden.

Es ergibt sich demnach, daß im doppelten Volumen des salzsauren Auszuges nicht doppelt so viel, sondern um etwa 25 Proz. weniger als das Doppelte an Eisen nachgewiesen wurde, wenn die HCl-Konzentration n/2 betrug, hingegen fast genau das Doppelte bei Verwendung von n/1 HCl.

Um bessere Resultate zu erhalten und das eventuell organisch gebundene Eisen freizumachen, wurde der salzsaure Auszug eingedampft, der Rückstand verascht und in entsprechend konzentrierter HCl gelöst, wobei die Lösung auf ihr ursprüngliches Volumen aufgefüllt wurde. Da erhielt ich

in 1,5 ccm der Lösung bei	n/2	HCl-Konzentration	6,0 $^1/_{1000}$	mg Fe
„ 1,5 „ „ „ „	n/1	„	7,5 $^1/_{1000}$	„ „
„ 1,5 „ „ „ „	2,5 n	„	5,0 $^1/_{1000}$	„ „

d. h. weit weniger als im entsprechenden Volumen des ursprünglichen Knochenauszuges. Es erschien ohne weiteres klar, daß für die Unstimmigkeiten im Verhalten des ursprünglichen Knochenauszuges die HCl-Konzentration verantwortlich zu machen war; für die Unstimmig-

keiten im Verhalten der eingedampften und veraschten Lösung war es jedoch wahrscheinlich, daß hier auch die Phosphate auf die Reaktion störend einwirken. Zur Klärung der Sachlage habe ich in verschiedenen Richtungen Versuche ausgeführt, über die in nachfolgendem berichtet werden soll.

Zunächst wurden in drei Versuchsreihen verschiedene, genau abgemessene Mengen einer Standardeisenlösung (enthaltend 5 Tausendstel mg Fe pro Kubikzentimeter) mit HCl in verschiedener Konzentration versetzt, das Gesamtvolumen jedesmal auf 6 ccm gebracht und nun der Eisenbestimmung unterzogen. Aus den Ergebnissen dieser drei Versuchsreihen, die in der Tabelle I mitgeteilt sind, geht klar hervor, daß man richtige Werte nur dann erhält, wenn man n/1,5 bis n/2,5, also durchschnittlich n/2 HCl verwendet.

Tabelle I.

HCl-Konzentration normal	Eisen		HCl-Konzentration normal	Eisen	
	in der Lösung enthalten $^{1}/_{1000}$ mg	kolorimetrisch gefunden $^{1}/_{1000}$ mg		in der Lösung enthalten $^{1}/_{1000}$ mg	kolorimetrisch gefunden $^{1}/_{1000}$ mg
3,5	10	6,7	$^{1}/$	15	15,0
1	10	9,8	$^{1}/_{2}$	15	15,0
$^{1}/_{2}$	10	10,0	$^{1}/_{2,5}$	15	15,0
5	15	6,4	$^{1}/_{3}$	15	13,9
3,5	15	8,6	$^{1}/_{4}$	15	13,9
2	15	13,4	3,5	20	10,9
1	15	14,3	$^{1}/_{2}$	20	20,0

Beträgt dagegen die HCl-Konzentration wesentlich weniger oder mehr, so läßt sich weit weniger Eisen nachweisen. Dieser Umstand war den genannten Autoren offenbar bereits bekannt, weil nach ihrer Vorschrift die Bestimmung bei einer HCl-Konzentration von n/2 HCl ausgeführt werden soll. Der störende Einfluß der höheren HCl-Konzentration dürfte dadurch bedingt sein, daß das $Fe(SCN)_3$-Molekül, dessen undissoziierter Zustand die Färbung bedingt (2), durch die starke Säure in Anwesenheit von Äther zersetzt wird, wobei farblose Verbindungen entstehen.

In einer anderen Reihe von Versuchen habe ich je 3 ccm obiger Eisenlösung, enthaltend je 15 Tausendstel mg Fe, mit wechselnden Mengen einer 13,9proz. Na_2HPO_4- bzw. einer 60,2proz. NaH_2PO_4-Lösung und mit konzentrierter HCl (*Kahlbaum*) versetzt, und dann zur Ausführung der Bestimmung jedesmal auf je 6 ccm aufgefüllt. Da 100 ccm der erstgenannten Phosphatlösung 83 ccm n/1 HCl, 100 ccm der zweitgenannten Lösung dagegen 416 ccm n/1 NaOH zu binden vermochten, mußte bei der Angabe der HCl-Konzentration diesem Umstande Rechnung getragen werden, und zwar mußte die gebundene

Säuremenge bei Verwendung von Na_2HPO_4 in Abzug gebracht, die Acidität des NaH_2PO_4 dagegen zu der Salzsäure hinzuaddiert werden.

Auf diese Weise wurden folglich die in der ersten Spalte der Tabelle II angegebenen Werte der HCl-Konzentration berechnet. In den übrigen Spalten sind die Fe-Mengen angegeben, die in den Gemischen nach Zugabe verschiedener Mengen des einen oder des anderen Phosphats nachzuweisen waren.

Tabelle II.

HCl-Konzentration normal	Kolorimetrisch gefunden $^1/_{1000}$ mg Fe nach Zusatz von						
	7 mg Na_2HPO_4	15 mg NaH_2PO_4	65 mg Na_2HPO_4	130 mg Na_2HPO_4	200 mg Na_2HPO_4	300 mg NaH_2PO_4	900 mg NaH_2PO_4
$^1/_6$	—	—	—	—	0	—	—
$^1/_3$	—	—	—	9,0	—	—	—
$^1/_{2,5}$	—	—	12,2	—	—	—	—
$^1/_2$	14,7	14,3	—	—	—	—	—
$^1/_{1,5}$	—	—	—	—	—	0	—
1	13,7	14,0	12,6	12,6	12,2	—	—
1,5	—	—	13,5	12,6	12,6	0	0
2,5	—	—	11,0	—	—	14,0	0
3	—	—	—	—	—	12,0	10,8

Den Daten dieser Tabelle II ist ohne weiteres zu entnehmen, daß ich stets weniger Eisen nachweisen konnte, als in der Lösung tatsächlich vorhanden war, ja bei Zusatz großer Phosphatmengen (300 bis 900 mg) und unterhalb einer bestimmten HCl-Konzentration überhaupt kein Fe nachzuweisen war.

Die Wechselwirkung zwischen Phosphaten und Eisensalzen ist in der analytischen Chemie längst bekannt, es wird doch die Phosphorsäure zur Beseitigung störender Eisenmengen mit Erfolg verwendet, ohne jedoch, daß die Natur des hierbei sich abspielenden Prozesses bisher restlos geklärt wäre. Erst die Untersuchungen von *Weinland* und *Ensgraber* (3) haben die Natur der komplexen Ferriphosphatverbindungen einigermaßen klargestellt, die als Derivate der Di- und Triphosphatoferrisäure Isomere des gewöhnlichen Ferriphosphats darstellen. Natürlich kann diese Phosphorferrisäure mit den verschiedensten alkalischen und erdalkalischen Metallen Verbindungen eingehen und somit komplexe Salze bilden, in welchen das dreiwertige Eisen mit den gebräuchlichen Reagenzien [ausgenommen das $K_4Fe(CN)_6$] nicht ohne weiteres nachzuweisen ist. Die genannten Forscher haben die Salze auch rein dargestellt, der genauen Erforschung dieser Salze stehen jedoch ihre Löslichkeitsverhältnisse im Wege, da „sämtliche Salze im Wasser sehr schwer löslich sind, beim Kochen damit zersetzen sie sich nur sehr langsam, wobei das Wasser saure Reaktion annimmt“.

Nicht nur das Kochen, sondern auch die Erhöhung der Säurekonzentration führt zu einer teilweise einsetzenden Spaltung dieser komplexen Verbindungen. So ist z. B. der vierten Spalte der Tabelle II zu entnehmen, daß bei Anwesenheit von 65 mg Na_2HPO_4 und einer HCl-Konzentration von n/2 statt 15 Tausendstel mg Fe bloß 12,2 Tausendstel mg nachgewiesen werden konnten, bei einer HCl-Konzentration von 1,5 n dagegen ließen sich bereits 13,4 Tausendstel mg vorfinden. Andererseits wurde, wie aus derselben Spalte der Tabelle II ersichtlich, bei weiterer Erhöhung der HCl-Konzentration wieder ein weit geringerer Wert für Fe erhalten.

Hieraus ergibt sich, daß es sowohl von der Säurekonzentration, wie auch von der Menge der anwesenden Phosphate abhängt, wieviel sich vom tatsächlich anwesenden Eisen in der Lösung nachweisen läßt.

Noch komplizierter gestalten sich die Verhältnisse, wenn in einer Lösung neben Eisensalzen verschiedene phosphorsaure Salze vorhanden sind. In der Tabelle III sind die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen zusammengestellt, in denen in einer Eisenlösung bald $Ca_3(PO_4)_2$, Na_2HPO_4 oder NaH_2PO_4 allein, bald das Calciumsalz gleichzeitig mit je einem der erwähnten Natriumphosphate, bald auch alle drei Salze zugleich anwesend waren.

Tabelle III.

Versuchsnummer	HCl-Konzentration normal	Zugesetztes			Kolorimetrisch nachweisbar $^1/_{1000}$ mg Fe
		Na_2HPO_4 mg	NaH_2PO_4 mg	$Ca_3(PO_4)_2$ mg	
1	$^1/_2$	—	—	26	13,5
2	1	—	—	26	13,5
3	$^1/_2$	—	—	78	12,5
4	$^1/_2$	65	—	—	12,2
5	$^1/_2$	65	—	26	13,5
6	$^1/_2$	65	—	52	11,0
7	1	65	—	26	14,3
8	2,5	—	300	—	13,9
9	2,5	—	300	26	14,7
10	1	—	300	26	14,7
11	$^1/_{1,5}$	65	300	—	0
12	1	65	300	26	14,7
13	2	65	300	26	14,7

Wie aus Tabelle III ersichtlich, erhielt ich in Versuch 4, wo 6,5 mg Na_2HPO_4 allein vorhanden waren, 12,2 Tausendstel mg Fe, in Versuch 5, wo außerdem noch 26 mg $Ca_3(PO_4)_2$ zugegen waren, 13,5 Tausendstel mg Fe. In Versuch 8, wo 300 mg NaH_2PO_4 allein vorhanden waren, fand ich 13,9 Tausendstel mg Fe, kamen aber in diese Mischung wie im Versuch 9 noch 26 mg $Ca_3(PO_4)_2$ hinzu, dann erzielte ich einen Wert von 14,7 Tausendstel mg Fe. Es sei betont, daß hierbei in den verglichenen

Versuchspaaren die HCl-Konzentration identisch war. Endlich konnte ich in Versuch 11, wo 300 mg NaH_2PO_4 und 65 mg Na_2HPO_4 vorhanden waren, überhaupt kein Eisen nachweisen. Sobald jedoch, wie im Versuch 12, noch 26 mg $Ca_3(PO_4)_2$ hinzukamen, betrug die nachweisbare Eisenmenge 14,7 Tausendstel mg Fe. Die HCl-Konzentration war in diesen beiden Versuchen wohl nicht identisch, doch auch nicht wesentlich verschieden. Wohl enthielt das Kaliumphosphat als Verunreinigung etwas Eisen, doch kann durch diese Beimengung (½ Tausendstel mg in jedem Versuch) der große Zuwachs im Versuch 12 durchaus nicht erklärt werden.

Hierzu kommt noch ein weiterer Umstand, dem ebenfalls praktische Bedeutung beigemessen werden muß. Ich stellte Parallelversuche an, wo Lösungen, deren Zusammensetzung jenen in den Versuchen 10 bis 12 entsprach, vor der Bestimmung des Eisengehaltes in Anwesenheit von Salzsäure im Wasserbade erhitzt worden sind. Es wurden da nachgewiesen:

in Versuch 14	16,2 $^1/_{1000}$ mg Fe	(statt	14,7	in Versuch	10)
„ „ 15	15,9 $^1/_{1000}$ „ „	(„	0	„ „	11)
„ „ 16	16,2 $^1/_{1000}$ „ „	(„	14,7	„ „	12)

Es folgt hieraus, daß *durch das Erhitzen in Anwesenheit von Salzsäure die komplexen Phosphate, welche das Eisen in nicht reaktionsfähigem Zustande enthalten, zersetzt werden und der Eisennachweis nunmehr glatt verlaufen kann.* Daß statt der zugesetzten 15 Tausendstel mg Eisenmenge durchschnittlich um 6 Proz. mehr erhalten wurde, rührt teilweise von der erwähnten Verunreinigung des Calciumphosphats mit Eisen, teilweise offenbar von Versuchs- bzw. Ablesungsfehlern her.

Auf alle Fälle erscheint es aussichtsvoll, die Eisenbestimmung in phosphathaltigen Lösungen nach vorherigem Erhitzen mit Salzsäure auszuführen.

Literatur.

1) *Autenrieth* und *Funk*, Münch. med. Wochenschr. **59**, 765, 1912. — 2) *Rosenheim* und *Cohn*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **27**, 296, 1901. — 3) *Weinland* und *Ensgraber*, ebendaselbst **84**, 340, 1914.

Quellungsuntersuchungen am Dünndarm.

Von

D. v. Deseö.

(Mitteilung aus dem physiologischen Institut
der k. ungarischen tierärztlichen Hochschule, Budapest.)

(Eingegangen am 6. Februar 1924.)

Die Quellungserscheinungen geben wichtige Anhaltspunkte zur Charakterisierung der Kolloide. Es wurden daher die verschiedensten Stoffe zur Untersuchung herangezogen, und es wurde festgestellt, daß sich die Stoffe nicht nur in ihrem Wasserbindungsvermögen, sondern auch in ihrem Verhalten den verschiedenen Salzen gegenüber unterscheiden. Solches Verhalten läßt sich auch bei den tierischen Kolloiden feststellen. Schon das Fibrin, das allgemein für das Prototyp der Eiweißsubstanzen angenommen wird, hat andere Eigenschaften als das Muskeleiweiß. Vielmehr noch unterscheiden sich vom Fibrin die Lipoide, die gewissermaßen ein entgegengesetztes Verhalten bekunden. Dieses verschiedenartige Verhalten tritt besonders deutlich den $H^{\cdot}$- und OH'-Ionen gegenüber zutage.

Die Quellung wurde seit den grundlegenden Untersuchungen von *Fr. Hofmeister* (1) immer wieder auch zur Deutung einiger Lebenserscheinungen herangezogen und verknüpft sich fast untrennbar mit der Lehre über die Resorption (2). Ich habe mir zur Aufgabe gestellt, die Quellungserscheinungen am Dünndarm zu studieren. Einerseits fand ich nämlich in der mir zugänglichen Literatur diesbezüglich keine genauen Daten vor, und andererseits schien es von Interesse zu sein, das Verhalten eines Gewebes kennenzulernen, das schon unter physiologischen Verhältnissen in nächster Berührung mit körperfremden Flüssigkeiten und Salzen steht.

Von den drei Versuchsmöglichkeiten, die zur Prüfung von Quellungsvorgängen dienen können, ist in unserem Falle weder die Bestimmung der Volumzunahme, noch die des Quellungsdruckes anwendbar, es kann folglich nur die durch Wägung bestimmbare Gewichtszunahme in Anwendung kommen. Bei dieser Bestimmungsart werden die abgewogenen Gewebsstücke in der Regel in die Flüssigkeit hineingehängt,

zeitweise mit einem Glashäkchen herausgezogen, mit Filtrierpapierstreifen abgetrocknet und nachher wieder gewogen. Es muß Sorge dafür getragen werden (3), daß die Gewebsstücke von gleicher Größe und Dicke seien, da sonst die Wasseraufnahme sehr ungleiche Werte liefern würde. Wohl ist die Dicke der Darmwand eine gegebene Größe, werden jedoch auch gleich große Stücke abgeschnitten, so fällt ihr Gewicht dennoch oft ungleich aus. Dies dürfte mit der ungleichmäßigen Kontraktion der Darmmuskulatur in Zusammenhang stehen. Das Abtrocknen mit Filtrierpapier gestaltet sich ebenfalls sehr umständlich, es können dabei leicht Gewebsteilchen abgerissen werden, und zwar dies um so mehr, als die Darmwand ihre Kontraktilität lange beibehält, wodurch ein Zusammenrollen der untersuchten Stückchen bedingt wird. Die Mukosa wird nämlich herausgestülpt, die Serosa dagegen eingerollt, so daß das Abtrocknen sehr erschwert ist. Meine ersten Versuche haben eben deshalb keine brauchbaren Resultate geliefert.

Bei den Versuchen mußte die Darmwand befestigt werden. Hierzu haben sich Wachslamellen vorzüglich bewährt. Der Darm wurde in entsprechend breite Segmente zerschnitten, die Segmente aufgeschlitzt und nachher mit physiologischer oder irgend einer anderen entsprechenden Lösung abgespült, vorsichtig abgetrocknet und mit Stecknadeln an diesen Lamellen befestigt, deren Gewicht schon vorher bestimmt worden ist. Die Darmwand kam aber dabei mit der Lamelle in keinerlei Berührung, sondern schwebte an den Stecknadeln befestigt frei über ihr.

Die Versuche wurden an Dünndarmstücken des Hundes ausgeführt. Die Tiere wurden in Äthernarkose durch Verblutenlassen getötet. Am vorletzten Tage haben die Tiere keine feste Nahrung erhalten, in der Wasseraufnahme wurden sie jedoch nicht eingeschränkt. Der Darm ist gewöhnlich 1 Stunde nach der Operation zur Verarbeitung gekommen. Es wurden ungefähr 1,5 cm breite Segmente abgeschnitten, nachdem das Mesenterium und das Fettgewebe mit der Schere gründlich entfernt worden war. Die abgeschnittenen Darmstücke wurden nun auch der Länge nach aufgeschlitzt, das Mucin mit einem Wasserstrahl entfernt, so daß die Schleimhautfalten deutlich zum Vorschein kamen. Die Darmwand fing sofort an sich zusammenzurollen, sie wurde deshalb mit Stecknadeln mit der Serosa nach unten auf einen Leinwandlappen ausgespannt und die Schleimhaut mit Filtrierpapier getrocknet, wobei jeder Druck peinlichst vermieden wurde. Die Darmstücke wurden dann mit den Stecknadeln an den Wachslamellen befestigt. Die in einer Versuchsreihe zur Untersuchung gelangenden Darmstücke kamen dann in ein großes verschließbares Glasgefäß, dessen Boden mit feuchtem Filtrierpapier bedeckt war, und verblieben hierin, bis alle Glieder der Versuchsreihe zur Untersuchung vorbereitet waren. Waren sämtliche Darmstücke einer Versuchsreihe auf diese Weise vorbereitet, so kamen sie alle, nachdem ihr Gewicht bestimmt worden ist, zu gleicher Zeit in die zu untersuchende Lösung. Nach dem Verstreichen der gewählten Versuchszeit wurden die Lamellen aus der Flüssigkeit herausgehoben, an einem weichen Leinwandstück schräg angelehnt, so daß das Wasser herabfließen konnte, und erst nach 5 Minuten mit Filtrierpapier getrocknet. Die auf diese Weise zur Wägung vorbereiteten Glieder wurden wieder im obigen Glasgefäße aufbewahrt. Es gelang aber auch bei größter Sorgfalt

nicht immer, die Versuchsfehler unter 5 bis 10 Proz. herabzudrücken. Als Ursache hierfür kann angenommen werden, daß das Gewicht der scheinbar gleich großen Stücke nicht immer ganz gleich war, andererseits aber haften die Muzinsubstanzen sehr zähe der Darmwand an, so daß es nicht immer gelang, sie, ohne die Darmwand zu schädigen, gänzlich zu entfernen. Endlich muß auch die Zersetzung des Gewebes berücksichtigt werden.

In den folgenden Versuchen wurde vorerst der Einfluß geprüft, den das Entfernen des Muzins verursachte. Von benachbarten Darmstücken wurden einige durch Abwaschen mit destilliertem Wasser von Muzin befreit, andere dagegen zwischen zwei befeuchtete Filtrierpapierstückchen gelegt, um das Ablösen von Muzinteilchen zu verhindern, und dann zur Untersuchung gebracht. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefaßt und zeigen, daß das Wasserbindungsvermögen gewaschener und mit Muzin bedeckter Darmstücke in destilliertem Wasser einen Unterschied von 10 Proz. ergibt. Da jedoch das Verwenden von Filtrierpapier sehr umständlich ist und dabei die Darmwand leicht gequetscht werden kann, so sah ich mich zur Entfernung des Muzins gezwungen. Dies schien mir um so zulässiger, als das Muzin doch nur ein Sekretionsprodukt der Darmwand darstellt.

Tabelle I.

Nr.	Anfangsgewicht d. Darmstückes	Nach 2 Stunden			Nach 12 Stunden			Bemerkung
		Gewicht	Gewichtszunahme		Gewicht	Gewichtszunahme		
	g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	
1	2,75 3,01	3,94 4,23	1,19 1,22	43,1 40,1	5,41 5,85	2,66 2,84	96,5 94,5	Das Muzin wurde entfernt
2	2,88 3,23	4,13 4,38	1,25 1,15	43,6 35,6	5,73 6,01	2,85 2,78	98,7 85,9	Wie vorher, aber mit Filtrierpapier bedeckt
3	2,24 2,59	3,26 3,75	1,02 1,16	45,2 44,8	4,82 4,46	2,57 2,88	114,4 110,8	Mit Filtrierpapier bedeckt, ohne das Muzin zu entfernen
4	2,74 2,98	4,19 4,39	1,46 1,42	53,2 47,6	5,66 5,89	2,92 2,91	105,9 97,7	Das Muzin wurde nicht entfernt

Die folgenden Versuche wurden ausgeführt, um zu ermitteln, ob zwischen verschiedenen Abschnitten des Dünndarms in Hinsicht ihres Wasserbindungsvermögens ein Unterschied besteht. Diese Untersuchungen wurden an Darmteilen ausgeführt, welche von beiden Enden eines 70 cm langen Darmstückes abgetrennt wurden. Die Stücke ließ ich in destilliertem Wasser quellen. Die Ergebnisse der Tabelle II lassen deutlich erkennen, daß zwischen den einzelnen Abschnitten des Dünndarms keine Unterschiede in ihrer Quellungsfähigkeit nachzuweisen sind.

Die Darmwand kann 116 Proz. ihres Gewichtes an Wasser in 18 Stunden binden, ohne damit das Quellungsmaximum erreicht zu haben. Es ist auffallend, daß in den parallelen Versuchen die größte Übereinstimmung in der aufgenommenen Wassermenge nach 8 Stunden besteht, während die Versuche von kürzerer oder längerer Dauer größere Unterschiede untereinander erkennen lassen. Dies kommt daher, daß die Momente, wodurch die Wasseraufnahme beeinflußt wird, erst nach längerer Zeit allmählich beseitigt werden und daher die Quellung erst nach etwa 8 Stunden in allen Darmstücken gleichmäßig ausgeprägt erscheint und in den Versuchen

Tabelle II.

Nr	Anfangsgewicht des Darmstückes	Nach 2 Stunden			Nach 5 Stunden			Nach 8 Stunden			Nach 18 Stunden			Insgesamt
		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		
	g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	Proz.
1	2,70	4,18	1,48	55,0	5,03	0,84	31,3	5,46	0,44	16,1	5,65	0,19	7,0	109,5
	2,30	3,65	1,35	58,5	4,32	0,67	29,4	4,71	0,39	17,01	4,86	0,14	6,3	111,2
2	2,49	3,91	1,42	57,2	4,87	0,96	38,5	5,36	0,49	19,6	5,71	0,36	14,3	129,5
	2,44	3,70	1,26	51,7	4,51	0,80	32,9	4,94	0,43	17,9	5,21	0,27	10,9	113,4
3	1,92	3,07	1,15	59,7	3,69	0,63	32,6	4,00	0,31	16,2	4,08	0,08	4,2	112,6
	2,42	3,99	1,57	64,6	4,80	0,81	33,5	5,25	0,45	18,4	5,28	0,03	1,3	117,8

wieder, welche länger als 8 Stunden dauerten, der allmählich, dabei nicht in jedem Darmstücke gleich stark einsetzende Gewebszerfall Gewichtsunterschiede bedingt. Die Wirkung der verschiedenen Salze wurde eben deshalb in Versuchen von kurzer Dauer untersucht.

Zur Untersuchung der Salzwirkung wurden einerseits die Verbindungen des Natriums mit verschiedenen Anionen und andererseits die Verbindungen des Chlors mit verschiedenen Kationen herangezogen. Die Versuchsflüssigkeiten wurden durch Verdünnung von Standardlösungen hergestellt, die auf ihre Richtigkeit mit dem Eintauchrefraktometer geprüft wurden. Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen III, IV und V zusammengefaßt. Die Salzwirkung erinnert an die *Hofmeister*sche Reihe, es fällt jedoch auf, daß sich die Reihenfolge mit der Konzentration ändert. Während nämlich bei n/40 Lösungen folgende Reihenfolge besteht: $CO_3 > NO_3 > Cl > COO.CH_3 > Br > SO_4 > F$ — $K > Na > Ba > Mg$, Ca, verhalten sich die einzelnen Glieder bei n/10 Lösungen wie folgt: $CO_3 > Br > NO_3 > CH_3.COO > F > Cl > SO_4$ — $K > Na > Ca$, $Mg > Ba$. Bei isotonischen Lösungen wieder, die ich nach den Angaben von *Landolt-Börnstein* (4) herstellte, läßt sich folgende Reihenfolge bilden: $CO_3 > COO.CH_3 > NO_3 > Br > Cl > SO_4$ — $K > Ca > Mg > Na$. Die Salzwirkungsreihe hat somit nur unter bestimmten Konzentrationsverhältnissen Gültigkeit, sie erfährt Änderungen, sobald die Konzentration geändert wird. Meine Versuchsergebnisse zeigen in dieser Hinsicht eine Übereinstimmung mit den Versuchen von *Lenk* (5), der seine Quellungsuntersuchungen an Gelatineplatten und Bohnen ausgeführt hat.

Tabelle V, in der die Quellungsergebnisse in isotonischen Lösungen aufgezeichnet sind, umfaßt Versuche von längerer Dauer. Die Wasseraufnahme hat ihren höchsten Wert nach 25 Stunden noch nicht erreicht, die Flüssigkeit, obgleich in diesem Falle Thymol verwendet worden ist, war stark getrübt, und es bildete sich ein Sediment. Es mußte deshalb der Versuch nach 25 Stunden unterbrochen werden und es konnte daher das Quellungsmaximum nicht bestimmt werden.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in Tabelle II mitgeteilten Werten, so fällt auf, daß die Darmstücke in destilliertem Wasser viel rascher quellen, als wenn auch Salze anwesend sind; die Salze begünstigen daher die Quellung nicht, ihre Wirkung besteht vielmehr in einer Herabsetzung der Quellungsgeschwindigkeit. Über das Quellungsmaximum kann natürlich dabei keine Angabe gemacht werden. Dies dürfte bei den

Tabelle III.

Lösungen von n/10 Konzentration.

	Anfangsgewicht des Darmstückes	Nach 1 Stunde			Nach 3 Stunden			Nach 8 Stunden			Insgesamt	Mittel
		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme			
	g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	Proz.	Proz.
NaCl	2,79	3,06	0,27	9,67	3,46	0,40	14,3	3,73	0,27	9,7	33,7	32,6
	2,91	3,20	0,28	8,5	3,61	0,41	14,1	3,87	0,26	8,9	31,5	
NaCOO.CH$_3$	2,34	2,73	0,39	16,7	3,00	0,27	11,5	3,29	0,29	12,4	40,6	38,6
	2,55	2,94	0,39	15,3	3,22	0,26	10,2	3,50	0,28	10,0	36,5	
NaBr	2,15	2,56	0,41	19,1	2,79	0,23	10,7	3,05	0,26	12,1	41,8	42,0
	2,30	2,73	0,43	18,7	3,00	0,27	11,7	3,27	0,27	11,7	42,2	
NaNO$_3$	2,74	3,20	0,46	16,8	3,51	0,32	11,7	3,85	0,34	12,4	40,9	41,2
	2,48	2,92	0,43	17,3	3,20	0,28	11,3	3,52	0,32	12,9	41,5	
NaF	2,74	3,10	0,36	13,1	3,35	0,25	9,2	3,66	0,31	11,3	33,6	35,1
	2,33	2,72	0,39	16,7	2,89	0,17	7,3	3,18	0,29	12,4	36,5	
Na$_2$CO$_3$	2,66	3,23	0,57	21,4	3,72	0,48	18,0	4,32	0,60	22,6	62,0	62,0
	2,26	2,76	0,50	22,1	3,18	0,42	18,5	3,66	0,48	21,2	61,9	
Na$_2$SO$_4$	2,63	2,96	0,33	12,5	3,17	0,21	7,9	3,41	0,24	9,1	29,6	28,2
	2,54	2,76	0,22	8,7	2,97	0,21	8,3	3,22	0,25	9,8	26,8	
HCl	2,46	3,00	0,54	22,0	3,50	0,50	20,3	3,79	0,29	11,8	54,1	54,2
	2,47	3,02	0,55	22,3	3,49	0,47	19,0	3,81	0,32	13,0	54,2	

Lösungen von n/40 Konzentration.

	Anfangsgewicht g	Gew. g	g	Proz.	Gew. g	g	Proz.	Gew. g	g	Proz.	Insgesamt Proz.	Mittel Proz.
NaCl	2,00	2,44	0,44	22,0	2,79	0,35	17,5	3,13	0,34	17,0	56,5	58,0
	1,75	2,19	0,44	25,1	2,54	0,35	20,0	2,79	0,25	14,3	59,4	
NaCOO.CH$_3$	1,93	2,34	0,41	21,2	2,64	0,30	15,5	3,01	0,37	19,2	56,0	54,7
	2,14	2,50	0,36	16,8	2,85	0,35	16,4	3,28	0,43	20,1	53,3	
NaBr	2,03	2,42	0,39	19,2	2,89	0,47	23,2	3,10	0,21	10,3	52,7	51,7
	1,99	2,25	0,26	13,1	2,51	0,26	13,5	2,99	0,48	24,1	50,7	
NaNO$_3$	1,86	2,26	0,40	21,6	2,62	0,36	19,4	2,98	0,36	19,4	60,2	58,6
	2,07	2,47	0,40	19,3	2,85	0,38	18,4	3,25	0,40	19,3	57,0	
NaF	2,10	2,40	0,30	14,3	2,60	0,20	9,5	2,84	0,24	11,4	35,2	37,7
	1,79	2,10	0,31	17,3	2,22	0,12	6,7	2,51	0,29	16,2	40,2	
Na$_2$CO$_3$	2,05	2,58	0,53	25,9	3,08	0,50	24,4	3,73	0,65	31,8	82,0	82,8
	2,07	2,72	0,65	31,4	3,16	0,44	21,3	3,80	0,64	30,9	83,6	
Na$_2$SO$_4$	2,30	2,72	0,42	18,3	3,13	0,41	17,8	3,28	0,15	6,5	42,6	47,8
	1,84	2,22	0,39	21,3	2,56	0,34	18,6	2,80	0,24	13,1	53,0	

physiologischen Vorgängen auch keine Bedeutung haben. Hier kommt es vielmehr auf die Geschwindigkeit an, spielt sich doch die Resorption in sehr kurzer Frist ab.

Der Resorption wirken somit die Salze allgemein entgegen. An der Darmwand entfalten Salze keine quellende Wirkung. Es bestehen daher an der Darmwand in dieser Hinsicht ebensolche Verhältnisse, wie im Bindegewebe, *Hauberrisser* und *Schönfeld* (5) konnten da wenigstens bei Anwendung von Natriumsalzen keine quellungsbefördernde Wirkung feststellen. Auch *Hamburger* (6) hat an den Epithelzellen der Darmwand nach Anwendung

Tabelle IV. Lösungen von n/10 Konzentration.

	Anfangsgewicht des Darmstückes	Nach 1 Stunde			Nach 3 Stunden			Nach 8 Stunden			Insgesamt	Mittel
		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme			
	g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	Proz.	Proz.
$CaCl_2$	2,43	2,72	0,29	11,9	3,0	0,28	11,5	3,23	0,23	9,5	32,9	31,5
	2,36	2,57	0,21	8,9	2,80	0,23	9,7	3,07	0,27	11,5	30,1	
KCl	2,25	2,70	0,45	20,0	3,02	0,32	14,2	3,40	0,38	16,9	51,1	51,0
	2,55	3,04	0,51	20,3	3,41	0,37	14,5	3,82	0,41	16,1	50,9	
$MgCl_2$	2,20	2,44	0,24	10,9	2,56	0,12	5,5	2,90	0,24	11,0	27,3	30,5
	2,11	2,39	0,28	13,3	2,59	0,21	10,0	2,81	0,22	10,4	33,6	
$BaCl_2$	2,36	2,60	0,24	10,2	2,78	0,18	7,6	2,99	0,21	8,9	26,7	26,9
	2,04	2,25	0,21	10,3	2,38	0,13	6,4	2,59	0,21	10,3	27,0	
Lösungen von n/40 Konzentration.												
$CaCl_2$	2,27	2,70	0,43	18,9	2,92	0,22	9,7	3,24	0,32	14,1	42,7	40,5
	1,95	2,28	0,33	16,9	2,59	0,21	10,8	2,79	0,20	10,5	38,2	
KCl	1,95	2,53	0,58	29,7	2,97	0,44	22,6	3,40	0,43	22,1	74,4	72,7
	2,31	3,00	0,69	29,8	3,42	0,42	18,2	3,95	0,53	22,9	70,9	
$MgCl_2$	2,07	2,54	0,47	22,7	2,83	0,29	14,0	3,14	0,31	15,0	51,7	50,9
	2,06	2,51	0,45	21,8	2,79	0,28	13,6	3,09	0,30	14,6	50,0	
$BaCl_2$	2,22	2,66	0,44	18,7	2,92	0,26	11,7	3,33	0,41	18,5	48,9	52,1
	1,88	2,31	0,43	22,9	2,58	0,27	14,4	2,92	0,34	18,1	55,3	

Tabelle V. Isotonische Lösungen.

	Anfangsgewicht des Darmstückes	Nach 6 Stunden			Nach 15 Stunden			Nach 25 Stunden			Insgesamt	Mittel
		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme			
	g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	Proz.	Proz.
NaCl	2,23	2,58	0,35	15,7	2,71	0,13	5,8	2,97	0,25	11,7	33,2	31,7
	2,42	2,63	0,21	8,7	2,93	0,30	12,4	3,15	0,22	9,1	30,2	
$NaCOO\cdot CH_3$	2,67	3,42	0,75	28,1	3,98	0,56	21,0	4,42	0,44	16,5	65,5	65,3
	2,00	2,57	0,57	28,5	3,00	0,43	21,5	3,30	0,30	15,0	65,0	
NaBr	2,45	2,87	0,42	17,2	3,08	0,21	8,6	3,26	0,39	15,9	41,6	39,4
	2,18	2,56	0,38	17,4	2,75	0,19	8,7	2,99	0,24	11,0	37,2	
$NaNO_3$	1,91	2,30	0,39	20,4	2,56	0,26	13,6	2,87	0,31	16,2	50,3	48,7
	2,15	2,63	0,48	22,3	2,85	0,22	10,2	3,16	0,31	14,4	47,0	
Na_2CO_3	2,03	3,09	1,06	52,2	4,63	1,54	75,9	5,70	1,06	52,2	180,3	178,1
	2,24	3,43	1,19	53,1	5,00	1,57	70,1	6,18	1,18	52,7	175,9	
Na_2SO_4	2,76	2,93	0,17	6,2	3,00	0,07	2,5	3,11	0,11	4,0	12,7	14,3
	2,33	2,56	0,23	9,9	2,61	0,05	2,1	2,70	0,09	3,9	15,9	
KCl	2,22	2,80	0,58	26,1	3,22	0,42	18,9	3,53	0,31	14,0	59,0	60,7
	2,29	2,88	0,59	25,8	3,34	0,46	20,1	3,72	0,38	16,6	62,4	
$CaCl_2$	2,01	2,45	0,44	21,9	2,70	0,25	12,4	2,79	0,09	4,5	38,8	38,9
	2,00	2,40	0,40	20,0	2,67	0,27	13,5	2,78	0,11	5,5	39,0	
$MgCl_2$	2,18	2,68	0,50	22,9	2,86	0,18	8,25	2,95	0,09	4,1	35,3	33,6
	2,48	2,95	0,47	19,0	3,16	0,21	8,46	3,27	0,11	4,4	31,9	

Tabelle VI.
Lösungen von n/10 Konzentration.

		Anfangsgewicht des Darmstückes	Nach 1 Stunde			Nach 3 Stunden			Nach 8 Stunden			Insgesamt	Mittel
			Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme		Gew.	Gewichtszunahme			
		g	g	g	Proz.	g	g	Proz.	g	g	Proz.	Proz.	Proz.
Dünndarm	NaCl	2,15	2,50	0,35	16,3	2,73	0,23	10,7	3,57	0,84	39,1	66,0	61,4
		2,24	2,60	0,36	16,1	2,84	0,24	10,7	3,51	0,67	29,9	56,7	
	Na_2SO_4	2,12	2,44	0,32	15,1	2,65	0,21	9,9	2,91	0,26	12,3	37,3	38,7
		2,09	2,44	0,35	16,7	2,64	0,20	9,6	2,91	0,27	14,0	40,3	
	Na_2CO_2	2,05	2,68	0,63	30,7	3,20	0,52	25,4	3,87	0,67	32,7	88,8	89,8
		1,86	2,44	0,58	31,2	2,97	0,53	28,5	3,55	0,58	31,2	90,8	
Musc. obl. abd. int.	NaCl	1,46	1,72	0,26	17,8	2,02	0,30	20,5	2,19	0,17	11,7	50,0	52,2
		1,40	1,70	0,30	21,4	1,98	0,28	20,0	2,16	0,18	12,9	54,3	
	Na_2SO_4	1,11	1,37	0,27	24,3	1,63	0,26	23,5	1,71	0,08	7,21	55,0	54,3
		1,40	1,73	0,33	23,6	2,05	0,32	22,9	2,15	0,10	7,2	53,6	
	Na_2CO_3	1,15	1,40	0,25	21,7	1,61	0,21	18,3	1,77	0,16	13,9	53,9	52,2
		1,53	1,90	0,37	24,2	2,12	0,22	14,5	2,30	0,18	11,8	50,4	

von NaCl-Lösungen immer eine Volumabnahme beobachtet, welche den osmotischen Differenzen nicht genau entsprach. Da der genannte Forscher die Epithelzellen durch Abschaben der Darmschleimhaut gewonnen hat, so wäre man zu der Annahme geneigt, daß dabei auch Darmsaft und somit OH'-Ionen in die Versuchsflüssigkeit gelangten, und es ist bekannt, daß in Anwesenheit der $H^{\cdot}$- und OH'-Ionen die Salze allgemein quellungshemmende Wirkungen entfalten. Eben deshalb habe ich in einer Versuchsreihe auch die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration mit der Indikatorenmethode von *Sörensen* geprüft. Gleich große Stücke der gewaschenen und ungewaschenen Darmwand wurden in 200 ccm destillierten Wassers quellen gelassen und die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration in verschiedenen Zeitintervallen geprüft. Es hat sich dabei ergeben, daß die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration fast genau dem des Neutralpunktes entspricht. Ich habe namentlich Werte von $p_H = 7{,}1$ bis $7{,}2$ gefunden und glaube daher, daß dadurch die quellungshemmende Wirkung der Salze erklärt werden kann.

Um nun das Verhalten der Darmwand in verschiedenen Salzlösungen mit quergestreiftem Muskelgewebe zu vergleichen, habe ich aus dem Musc. obliquus abdominis internus eines Hundes Lamellen geschnitten, wo beide Oberflächen (Bauchfell und Aponeurose) von einigermaßen ähnlicher Beschaffenheit sind, wie die der Darmstücke. Die Versuchsflüssigkeiten enthielten NaCl, Na_2CO_3 und Na_2SO_4 in n/10 Konzentration. Es ist von Interesse, zu verzeichnen, daß, obwohl auch die Darmwand ziemlich viel — allerdings nicht quergestreiftes — Muskelgewebe enthält, auffallende Unterschiede im Quellungsvermögen der Darmwand und der Muskellamellen bestehen. Während nämlich (s. Tabelle VI) bei der Quellung der Darmwand verschiedene Ionen einen verschiedenen Einfluß auf die Menge des aufgenommenen Wassers ausüben, verhalten sich verschiedene Salze während der gewählten Versuchszeit den Muskellamellen gegenüber ziemlich gleichmäßig. Vielleicht lassen sich diese Erscheinungen als das Produkt der Quellung und der ihr entgegenarbeitenden osmotischen Vorgänge deuten.

Zusammenfassung.

Die quellende Wirkung verschiedener Salzlösungen wurde an Dünndarmstücken des Hundes geprüft, welche, an Wachslamellen befestigt, in Salzlösungen gebracht wurden. Die Salzwirkung ist je nach der Konzentration der verwendeten Lösung verschieden und äußert sich im allgemeinen in einer Herabsetzung der Quellungsgeschwindigkeit.

Literatur.

1) *Fr. Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **26**, 3915, 1890; **28**, 210, 1891. — 2) *Ellenberger* und *Scheunert*, Lehrb. d. vergl. Physiol. d. Haussäugetiere, 2. Aufl., 1920, S. 218. — 3) *Wo. Ostwald*, Pflügers Arch. **108**, 563. — 4) *Landolt-Börnstein*, Phys.-chem. Tabellen, 4. Aufl., S. 811. — 5) *E. Lenk*, diese Zeitschr. **73**, 15, 1916. — 6) *E. Hauberrisser* und *F. Schönfeld*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **71**, 102, 1912. — 7) *Hamburger*, zitiert nach *R. Höber*, Pflügers Arch. **86**. 201, 1901.

Untersuchungen über die Aminosäurenausscheidung des Säuglings im Hungerzustande und bei Eiweißüberfütterung nebst Bemerkungen zur Formoltitration in kleinen Harnmengen.

Von

F. v. Bernuth und **F. Goebel.**

(Aus der Universitäts-Kinderklinik zu Jena.)

(Eingegangen am 6. Februar 1924.)

Dem Säugling ist eigentümlich eine höhere Aminosäurefraktion im Harne, als das ältere Kind und der Erwachsene sie aufweisen, d. h. ein größerer Prozentsatz des Gesamt-N im Harne entfällt auf den Aminosäure-N. Während ältere Kinder nach eigenen Untersuchungen im Durchschnitt eine Aminosäurefraktion von 1,85 Proz. haben, beträgt sie beim Säugling durchschnittlich 4,62 Proz. Die Angaben anderer Autoren (*Pfaundler*, *Simon*, *Schlutz*, *Hadlich* und *Grosser*) besagen dasselbe, wenn auch die betreffenden Werte bei dem einen höher, bei dem anderen tiefer liegen; das kommt daher, daß bei der zumeist angewandten Methodik der Formoltitration nach *Henriques-Sörensen* subjektive Unterschiede vorkommen können, da nicht auf Farbumschlag, sondern bis zur starken Rotfärbung mit Phenolphthalein titriert wird. Unter den Säuglingen nimmt eine bestimmte Gruppe eine Sonderstellung ein, nämlich die Frühgeborenen, d. h. Kinder mit einem Geburtsgewicht von unter 2500 g, insofern, als bei ihnen die Aminosäurefraktion im allgemeinen noch wesentlich höher ist als sonst beim Säugling und Werte von 9,5 bis 25,5 Proz. erreicht. Mit der Unreife der Frühgeborenen hat diese Erscheinung unmittelbar nichts zu tun, da sie monatelang bestehen bleiben kann, bis zu einer Zeit also, wo der Reifezustand der Kinder dem von ausgetragenen jungen Säuglingen gleichgekommen ist.

Überhaupt beruht unserer Ansicht nach das Phänomen der hohen Aminosäurefraktion beim Säugling nicht auf irgendwelcher Unreife oder Unterwertigkeit bestimmter Stoffwechselfunktionen, namentlich der Desaminierungsfähigkeit, sondern auf einer funktionellen Besonderheit der Nieren. Denn der Aminosäurespiegel des Blutes liegt beim

Säugling nicht höher als bei älteren Menschen, und der Eiweißgehalt der Nahrung übt keinen Einfluß auf seine Höhe aus, selbst nicht, wie wir unten sehen werden, bei extremer Zufuhr von Eiweißkörpern. Die Niere des Säuglings scheint für Aminosäuren durchlässiger zu sein als im späteren Leben, und offenbar besteht dabei ein Zusammenhang mit den besonderen Ernährungsverhältnissen im ersten Lebensjahre. Der Säugling nimmt die zum Ersatz, zur Energieerzeugung und zum Ansatz notwendigen Nahrungsstoffe in einem sehr viel wasserreicheren Milieu zu sich als der ältere Mensch, in der Milch und den bei künstlicher Ernährung üblichen Milchverdünnungen. Infolgedessen ist auch seine Harnausscheidung verhältnismäßig größer als im späteren Leben, und einige Beobachtungen, die der eine von uns hat anstellen können, ließen Zusammenhänge zwischen Harnmenge und Aminosäurefraktion erkennen in der Weise, daß bei demselben Kinde und unter sonst gleichen Bedingungen bei einer wasserreicheren Nahrung die Aminosäureausscheidung höher ist als bei einer wasserärmeren Kost.

Die Frage, ob der im Harne erscheinende Aminosäure-N aus dem Nahrungseiweiß oder aus dem Körpereiweiß, also aus dem ektogenen oder endogenen Stoffwechsel stammt, ist belanglos geworden, seitdem wir wissen, daß der gesamte Eiweißabbau, der endogene ebenso wie der ektogene, über die Aminosäuren geht und es somit unmöglich ist, zu entscheiden, ob im Blute auftretende Aminosäuren aus dieser oder jener Quelle herrühren. Daß der Aminosäure-N des Harns zum Teil aus dem Abbau des Körpereiweißes stammt, geht daraus hervor, daß schon das Neugeborene am ersten Lebenstage Aminosäuren im Harne ausscheidet. Aber in den ersten Lebenstagen, nachdem die Nahrungszufuhr eingesetzt hat und schnell zu der Höhe des Erhaltungs- und Anwuchsbedarfs ansteigt, ist die Aminosäurefraktion zunächst verhältnismäßig niedrig und erreicht erst mit dem Ende der Neugeborenenperiode die für den Säugling eigentümliche Höhe (*Simon*).

Es scheint, daß der Hungerzustand den Eiweißstoffwechsel im Sinne einer Herabsetzung der Desaminierung beeinflußt; Erfahrungen beim Erwachsenen von *Brugsch* und *Hirsch* sprechen in diesem Sinne. Eigene Versuche, die der eine von uns an hungernden Säuglingen, natürlich nur in ganz beschränktem Umfange, anstellen konnte, zeigten keine Erhöhungen der Aminosäurefraktion, sondern Werte, die eher tiefer lagen als üblich.

Infolgedessen haben wir gerne die Gelegenheit benutzt, die Aminosäureausscheidung bei einem Neugeborenen zu untersuchen, das infolge eines angeborenen Verschlusses der Speiseröhre bis an sein Lebensende im absoluten Hungerzustande verharrte. Wir machten unsere Bestimmungen am vierten Lebenstage, zu einer Zeit, wo das Kind noch nicht fieberte und keine Zeichen einer Lungenentzündung erkennbar

waren. Eine Pneumonie war wie immer in solchen Fällen unausbleiblich wegen einer nachgewiesenen fistulösen Verbindung zwischen dem unteren Ösophagusabschnitt und damit dem Magen und der Luftröhre. In der Tat ist unser Patient dann auch 24 Stunden nach Abschluß unserer Untersuchungen an einer Pneumonie erkrankt. Wir legen deshalb Wert darauf, daß das Kind am Tage der Blut- und Urinentnahme noch gesund war, weil bei einer Pneumonie mit ihrem gesteigerten Eiweißabbau keine reinen Verhältnisse mehr vorgelegen hätten.

Die Blutuntersuchung nach *Bang* ergab folgendes (für 100 ccm Blut):

mg Harnstoff-N	mg Aminosäure-N	mg Rest-N
21	46	67

Dieser Wert von 46 mg Aminosäure-N ist abnorm hoch, der höchste, den wir je gefunden haben. Nach unseren Erfahrungen überschreitet der Wert beim normalen Säugling nicht die Höhe von 24 mg. Ehe wir einen Schluß auf eine herabgesetzte Desaminierungsfähigkeit dieses hungernden Organismus ziehen, müssen wir die Aminosäureausscheidung im Harn bestimmen. Sie ergibt folgendes:

mg Gesamt-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N auf 100 mg Gesamt-N
412	101,56	24,65

Es ist also sowohl der Aminosäure-N des Blutes abnorm vermehrt, als auch die Aminosäurefraktion im Harne ungewöhnlich hoch. Es kann also keine Retention von Aminosäure-N im Blute infolge einer geringen Ausscheidung durch die Nieren, vielleicht im Zusammenhang mit mangelndem Harnwasser, angenommen werden. Wir müssen den Schluß ziehen, daß unter dem Einfluß des Hungers in der Tat die Desaminierungsfähigkeit geschädigt ist.

Um dafür einen weiteren Anhalt zu bekommen, haben wir dem Kinde noch Aminosäure zugeführt, indem wir 2 g Glykokoll in wässeriger Lösung intravenös injizierten. Nach einer Stunde wurde Blut entnommen und analysiert und der Harn von dem Zeitpunkte der Injektion ab durch 6 Stunden aufgefangen, bis ebensoviel ausgeschieden war, wie wir vorher zur Bestimmung der Aminosäurefraktion zur Verfügung gehabt hatten, nämlich 7,5 ccm. Die Ergebnisse sind folgende:

Nach Injektion von 2 g Glykokoll für 100 ccm Blut:

mg Harnstoff-N	mg Aminosäure-N	mg Rest-N
23	22	45

für den Harn:

mg Gesamt-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N auf 100 mg Gesamt-N
438	161,97	36,98

Es hat also die Zufuhr des Glykokolls zu einer Ausschwemmung der Aminosäuren aus dem Blute geführt; dabei ist im Harne nicht

nur die Aminosäurefraktion, sondern auch die absolute Menge der Aminosäuren angestiegen, da der Harn im ganzen etwas stickstoffreicher geworden ist. Ob das Glykokoll mit ausgeschieden oder desaminiert worden ist, muß dahingestellt bleiben, da seine chemische Identifizierung in so geringen Harnmengen, wie wir sie hier zur Verfügung hatten, unmöglich ist.

Die Höhe der Aminosäurefraktion ist von dem Eiweißgehalt der Nahrung, wenigstens bei natürlicher und den üblichen Methoden der künstlichen Ernährung unabhängig; Brustkinder scheiden nicht mehr Aminosäuren aus als Kinder mit eiweißreicherer Kuhmilchnahrung. Eine Reihe von Versuchen, die wir mit anderen Zielen anstellten, hat uns gezeigt, daß auch im Übermaß zugeführtes und resorbiertes Eiweiß im Stoffwechsel des Säuglings genau so verarbeitet wird wie beim Erwachsenen. Der Aminosäure-N im Blute erreicht bei mit Eiweiß überfütterten Säuglingen keine übernormale Höhe, und die Aminosäurefraktion im Harne ist nicht größer als in der Vorperiode. Wir haben eine Anzahl von Kindern zuerst mit einer konzentrierten Nahrung, der Buttermehlvollmilch nach *Moro* (Vollmilch mit 3 Proz. Mehl, 5 Proz. Butter, 7 Proz. Zucker), ernährt und dabei folgende Werte gefunden:

1. im Blute (auf 100 ccm):

	mg Aminosäure-N	mg Harnstoff-N	mg Rest-N
Fall 1	15	21	36
„ 2	17	17	34
„ 3	15	27	42

2. im Harne:

	mg Gesamt-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N auf 100 mg Gesamt-N
Fall 1	161	17,1	10,6
„ 2	384	21,7	5,65
„ 3	97	6,1	6,25

Dann wurde in dieser Nahrung das Fett durch isodyname Mengen von Plasmon ersetzt, so daß die Kinder in 500 bis 600 g Vollmilch bei unvermindertem Kohlehydrat 65 bis 70 g Plasmon bekamen. Die entsprechenden Werte im Blute und Harne waren folgende:

1. im Blute (auf 100 ccm):

	mg Aminosäure-N	mg Harnstoff-N	mg Rest-N
Fall 1	25	43	68
„ 2	10	20	30
„ 3	15	34	49

2. im Harne:

	mg Gesamt-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N in 100 ccm Harn	mg Aminosäure-N auf 100 mg Gesamt-N
Fall 1	1695	42,7	2,5
„ 2	1526	53,3	3,49
„ 3	860	34	3,95

Im Blute ist also bei der Überfütterung mit Eiweiß der Aminosäure-N nur in dem Falle 1 vermehrt, im Falle 2 aber vermindert und im Falle 3 unverändert. Drei Bestimmungen an anderen Kindern, die in den Tabellen nicht aufgeführt sind, hatten ebenfalls einmal eine Verminderung, zweimal eine kleine Vermehrung des Aminosäure-N im Blute ergeben. Es steigt also bei übermäßiger Eiweißzufuhr der Aminosäurespiegel des Blutes entweder nur wenig und nicht über normale Werte hinaus an, oder er bleibt unverändert, oder er nimmt sogar ab. Daraus folgt, daß der Säugling auch unter diesen extremen Bedingungen eine vollwertige Fähigkeit zur Desaminierung besitzt. Die Aminosäurefraktion im Harne ist in allen drei Fällen gesunken. Selbstverständlich ist während der Eiweißüberfütterung absolut mehr Aminosäure-N im Harne ausgeschieden worden als in der Vorperiode, denn die Aminosäurefraktion hat sich in einem geringeren Verhältnis vermindert, als sich der Gesamt-N vermehrt hat. Aber das Verhältnis von Aminosäure-N zum Gesamt-N ist kleiner geworden, so daß also auch hiernach sicher keine Unterwertigkeit der Desaminierungsfähigkeit angenommen werden kann.

Es bestätigen also diese Versuche mit Eiweißüberfütterung unsere Ansicht, daß die hohe Aminosäurefraktion des Säuglings nicht in einer Unreife seines Eiweißstoffwechsels begründet sein kann.

Wir haben diese Aminosäurebestimmungen, ebenso wie der eine von uns in seiner früheren Arbeit, mit der Formoltitration nach *Henriques* und *Sörensen* vorgenommen und dabei einige kleine Modifikationen der Methode angewandt, die ihre Brauchbarkeit für unsere Zwecke erhöht haben. Nach der Originalvorschrift, wie sie zusammengefaßt *Andersen* angibt, erreicht man bei der Titration den richtigen Farbton — man muß Lauge zufügen bis zu starker Rotfärbung mit Phenolphthalein — in folgender Weise: Man bereitet eine Kontrollösung, indem man 40 ccm kohlensäurefreies destilliertes Wasser mit 20 ccm der vorschriftsmäßig hergestellten phenolphthaleinhaltigen Formolmischung versetzt und 5 ccm n/5 Baryt- oder Natronlauge dazufügt. Darauf wird unter Schütteln mit tropfenweisem Zutun von n/5 Salzsäure zurücktitriert, bis die vorher stark rote Flüssigkeit nur noch einen schwach rosa Farbton aufweist (erstes Stadium). Dann wird ein Tropfen n/5 Lauge zugesetzt, wodurch die Kontrollösung deutlich rot gefärbt wird (zweites Stadium), und dann noch weitere zwei Tropfen n/5 Lauge, wodurch die Flüssigkeit eine stark rote Farbe erhält (drittes Stadium).

Die zu untersuchende vorbereitete und mit der Formolmischung versetzte Harnprobe wird bis zu dieser letzten Farbenstärke titriert, indem man aus der Bürette n/5 Baryt- oder Natronlauge zuträufeln läßt bis zur

Rotfärbung und dann noch einige Kubikzentimeter dazugibt. Dann wird mit n/5 Salzsäure zurücktitriert, bis die Flüssigkeit rosa und deutlich heller als die Kontrollösung geworden ist, und jetzt Lauge zugefällt, bis der Farbton der Kontrollösung genau erreicht ist.

Von der so verbrauchten Menge n/5 Lauge, abzüglich der verwandten Menge n/5 Salzsäure, wird die Menge n/5 Lauge abgezogen, die nötig war, um (gleichfalls unter Abzug der Menge n/5 Salzsäure) die Kontrollösung auf den stark roten Farbton zu bringen. Die Differenz zwischen diesen beiden Ziffern der jeweilig verbrauchten n/5 Lauge, multipliziert mit 2,8, gibt in Milligrammen die Menge des in der Harnprobe vorhandenen Aminosäure-N + Ammoniak-N an. Die Subtraktion des Ammoniak-N ergibt dann die Menge des freien Aminosäure-N.

Bei unseren Untersuchungen im Säuglingsharn, besonders in solchen Fällen wie der mitgeteilte von angeborenem Speiseröhrenverschluß, stehen uns oft so geringe Mengen zur Verfügung, daß man nicht in verschiedenen Urinportionen die Formoltitration und die Amoniakbestimmung vornehmen kann. Wir haben deshalb in der Regel nach Vorbehandlung des Harns mit Bariumchlorid und Bariumhydroxyd nach *Krüger* und *Reich* das Ammoniak entfernt und eventuell bestimmt, dann den gesamten Rückstand, und nicht etwa, wie *Henriques* und *Sörensen* angeben, nur einen aliquoten Teil davon, nach Lösung in Salzsäure und vorschriftsmäßiger Neutralisation zur Formoltitration benutzt. Auf diese Weise wird die Titration in einer größeren Harnmenge ausgeführt als nach der Originalvorschrift, was dann nicht ohne Bedeutung ist, wenn man von vornherein nur wenig Urin zur Verfügung hat.

Bei der vorschriftsmäßigen Formoltitration auf Farbgleichheit mit der Kontrollösung verursacht häufig die Eigenfarbe des Urins, besonders in hochgestellten Harnen, mit denen wir in den mitgeteilten Untersuchungen zu arbeiten hatten, eine lästige Störung, da man einen von der Kontrolllösung stark abweichenden Farbton erhält. Es gibt zwar Methoden, um die Eigenfarbe des Urins zu beseitigen (*Sörensen* und *Jessen-Hansen, Bang*), aber sie sind mehr oder weniger umständlich. Deswegen haben wir in den mit Formol versetzten Harn so lange unter ständigem Schütteln auf weißem Untergrund Lauge zutropfen lassen, bis der einfallende Tropfen nicht mehr eine deutlich erkennbare rote Farbwolke erzeugte.

In Kontrollversuchen wurde bestimmt, wieviel Lauge zu derselben Menge neutralisierter, mit Phenolphthalein versetzter Formollösung zugegeben werden mußte, bis ebenfalls der einfallende Tropfen Lauge als rote Wolke nicht mehr deutlich zu erkennen war. Die Differenz zwischen der ersten und zweiten Ziffer für die verbrauchte Lauge ergibt die Menge der zu der Neutralisation der Aminosäuren verbrauchten Lauge. Daß so auf starke Rotfärbung titriert wird, ist klar; zu hohe Werte können sich kaum ergeben, da die Rotfärbung in der reinen Formollösung ebenso intensiv sein muß, wie in dem Urin. Die Eigenfarbe stört nicht, selbst wenn sie stark hervortritt, und schließlich erspart man sich die Herstellung einer Kontrolllösung für jede Titration. Denn wenn man den vorbehandelten Urin immer mit derselben Menge neutralisierten Formols aus derselben Standflasche versetzt, weiß man ein für allemal, wie viel Lauge zu der Rotfärbung des Formols allein verbraucht wird. Diese beiden kleinen Modifikationen, die das Prinzip der Methode nicht berühren, haben sich uns in den früheren und jetzigen Bestimmungen des Aminosäure-N im Harn gut bewährt. Über methodische Einzelheiten siehe die frühere Arbeit von *Goebel*.

Literatur.

1) *Andersen*, Die stickstoffhaltigen Körper des Harns in „Der Harn usw." von *Neuberg*, 1. Teil. Berlin 1911. — 2) *Bang*, diese Zeitschr. **22**, 1916. — 3) *Brugsch*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **1**, 418, 1905. — 4) *Brugsch* und *Hirsch*, ebendaselbst **4**, 947, 1907. — 5) *Goebel*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **34**, 93, 1922. — 6) *Hadlich* und *Grosser*, Jahrb. f. Kinderheilk. **73**, 421, 1911. — 7) *Henriques* und *Sörensen*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**, 27, 1909. — 8) *Dieselben*, ebendaselbst **64**, 120, 1909. — 9) *Hirsch*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **1**, 141, 1905. — 10) *Krüger* und *Reich*, siehe bei *Andersen*. — 11) *Pfaundler*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 75, 1900. — 12) *Schlutz*, Jahrb. f. Kinderheilk. **72**, 94, Erg.-Heft. — 13) *Simon*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **2**, 1, 1911. — 14) *Sörensen* und *Jessen-Hansen*, diese Zeitschr. **7**, 407, 1907.

Über den Harnstoffgehalt der roten Blutkörperchen.

Von

Zoltán Aszódi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der k. ungarischen Universität Budapest.)

(Eingegangen am 11. Februar 1924.)

Bei der prinzipiellen Wichtigkeit der Frage über die Verteilung gewisser gelöster Bestandteile (Glucose, Cl, Reststickstoff) im Blute, und — hiermit im Zusammenhang — der Frage, ob die roten Blutkörperchen für diese Stoffe durchgängig seien oder nicht, wirkt es durchaus nicht klärend, wenn nach der *einen* Ansicht alles, was von diesen Stoffen im Blute enthalten ist, im Plasma, nichts von ihnen in den roten Blutkörperchen zu finden sei, nach einer zweiten Ansicht die genannten Stoffe in Plasma und in Blutkörperchen in gleicher, nach einer dritten Ansicht in verschiedener Konzentration (im Plasma mehr) angetroffen werden.

Während es in einfacheren Problemen ein leichtes ist, die Ergebnisse der Autoren nach den mitgeteilten Verfahren und Untersuchungsbelegen zu beurteilen, haben wir es bei der Bestimmung der genannten Blutbestandteile mit recht heiklen Verfahren, zudem im Blute mit einem Medium zu tun, durch dessen Eiweißreichtum die Schwierigkeiten der Bestimmungen noch um ein Vielfaches gesteigert werden; was zur Folge hat, daß sich die Ergebnisse der verschiedenen Autoren, ob dieselben oder aber verschiedene Verfahren angewendet wurden, in den meisten Fällen nur schwer kontrollieren und beurteilen lassen. Auf ein solches beinahe aussichtsloses Unterfangen will ich nach Tunlichkeit verzichten und im nachstehenden einfach über Versuche berichten, aus denen hervorgeht, daß *im Harnstoffgehalt von Plasma und roten Blutkörperchen des Menschenblutes am Nierengesunden kein nachweisbarer Unterschied besteht, daß aber das Plasma im Blute von Nierenkranken den Harnstoff in etwas größerer Konzentration enthalten kann als die roten Blutkörperchen.*

Methodik.

Die Harnstoffbestimmungen wurden in dem von mir seinerzeit beschriebenen, Hämocarbamidometer[1]) benannten Apparate mittels des von *Partos*[2]) und dann von mir[3]) beschriebenen Ureaseverfahrens ausgeführt, das darin besteht, daß Harnstoff durch die Urease in kohlensaures Ammonium verwandelt, aus diesem die Kohlensäure in Freiheit gesetzt und aus dem hierdurch erzeugten Druck auf die Menge des ursprünglich vorhanden gewesenen Harnstoffs gefolgert wird. Zu den Versuchen diente mir das Blut nierengesunder und nierenkranker Menschen; und zwar wurde in *einer* Gruppe der Versuche *Gesamtblut und Serum*, in einer anderen Gruppe *Gesamtblut, Serum und Plasma geprüft.*

Gesamtblut. Es wurde die Venaepunktion ausgeführt, 10 bis 15 ccm Blut direkt aus der Punktionsnadel in einem kleinen Proberöhrchen aufgefangen, letzterem sofort mittels einer kalibrierten Pipette 3 bis 5 ccm entnommen und zur Verhütung der Gerinnung in ein kleines Kölbchen fließen gelassen, das genau mit demselben Volumen einer 0,25proz. Lösung von oxalsaurem Kalium beschickt war. Diese Lösung enthielt auch 0,5 Proz. Weinsäure, welch letztere die Aufgabe hatte, präformierte Kohlensäure aus der zu untersuchenden Flüssigkeit auszutreiben. Während aber dies am Serum, wie ich seinerzeit mitgeteilt habe[4]), vollkommen gelingt, bleibt im Blute immer ein Rest von Kohlensäure zurück, der erst durch die verdünnte Schwefelsäure ausgetrieben werden kann. Da nun diese Kohlensäure zu derjenigen hinzutritt, die aus dem umgewandelten Harnstoff hervorgeht und eine größere Menge von Harnstoff vortäuschen kann, als in der Tat vorhanden war, müssen bei der Untersuchung des Blutes zwei mit Blut und Schwefelsäure beschickte Apparate aufgestellt werden, und zwar einer *ohne* und ein zweiter *mit* Urease. Der Hg-Anstieg, den man im erstgenannten Apparate erhält, wird von dem Anstieg im zweiten abgezogen; es ergibt sich ein Wert, der genau dem Harnstoffgehalt der untersuchten Flüssigkeit entspricht.

Serum. Gleich nach der ersten wurde eine zweite Blutprobe, etwa 10 ccm, in einer kleinen Probierröhre aufgefangen und der Spontangerinnung überlassen. Vom Serum wurden einige Kubikzentimeter mittels einer genau graduierten Pipette abgehoben, mit genau demselben Volumen der oben (beim Gesamtblut) verwendeten Oxalat-Weinsäurelösung vermischt und dann der weiteren Behandlung zugeführt.

Plasma. a) Eine dritte Blutprobe, etwa 15 ccm, wurde in einem Zylinderglas mit eingeschliffenem Glasstopfen aufgefangen, der mit 4 bis 10 mg Hirudin beschickt war, gut durcheinandergemischt und zentrifugiert.

b) In einer anderen Reihe von Versuchen wurde diese dritte Blutprobe ohne jedweden Zusatz in einem mit Paraffin ausgegossenen Zentrifugierröhrchen aufgefangen und zentrifugiert (Tourenzahl 2000 pro Minute). Da die Zentrifugierröhrchen vorangehend austariert waren und die Venaepunktion kaum fünf Schritt weit von der Zentrifuge ausgeführt wurde, dauerte es keine ganze Minute bis zum Beginn des Zentrifugierens, keine 4 Minuten bis zur erfolgten Trennung von Plasma und Blutkörperchen.

---

[1]) *Z. Aszódi*, diese Zeitschr. **184**, 546.
[2]) *S. Partos*, ebendaselbst **103**, 292.
[3]) *Z. Aszódi*, ebendaselbst **128**, 391.
[4]) l. c., S. 548.

Von dem nach der einen oder anderen Art gewonnenen klaren Plasma wurden 2 bis 3 ccm mittels einer genau kalibrierten Pipette abgehoben, mit dem gleichen Volumen der oben verwendeten Oxalat-Weinsäurelösung vermischt und der weiteren Behandlung zugeführt.

Am Serum und am Plasma war dem Oxalat selbstredend keine Rolle mehr zugedacht; ich habe es bloß verwendet, um bei der Ureasegärung identische Verhältnisse, wie sie am Blute gegeben waren, zu schaffen.

Versuchsergebnisse.

Tabelle I.

Versuchs-nummer	Datum des Versuches	An Nierengesunden Harnstoff mg in 100 ccm		
		Gesamtblut	Serum	Plasma
1	17. I. 1923	24,0	24,1	—
2	22. I. 1923	27,1	26,2	—
3	15. X. 1922	28,6	30,8	—
4	11. X. 1922	29,2	29,9	—
5	20. I. 1923	30,9	30,9	—
6	18. I. 1923	31,2	32,8	—
7	25. I. 1923	31,7	33,1	—
8	24. X. 1922	34,7	35,8	—
9	22. X. 1922	35,1	34,2	—
10	31. X. 1922	35,6	34,8	—
11	23. I. 1923	36,0	34,5	—
12	13. XII. 1922	36,4	36,0	—
13	10. II. 1923	37,1	36,8	—
14	12. X. 1922	40,6	40,0	—
15	22. IX. 1923	37,5	36,6	—
		495,7	496,5	—
	Mittelwerte .	**33,0**	**33,1**	—
16	10. XI. 1923	17,0	19,0	19,0 (P)
17	24. IV. 1923	22,6	23,9	23,4 (P)
18	22. II. 1923	24,9	24,9	25,5 (H)
19	24. II. 1923	25,4	24,2	24,7 (H)
20	29. III. 1923	26,4	26,0	26,7 (H)
21	18. IV. 1923	29,9	27,3	26,6 (P)
22	17. IV. 1923	39,7	38,0	40,0 (H)
		185,9	183,3	185,9
	Mittelwerte .	**26,6**	**26,2**	**26,6**

(P) = Zentrifugieren in mit Paraffin ausgegossenen Röhrchen.
(H) = Zentrifugieren des mit Hirudin versetzten Blutes.

A. In der Tabelle I sind die Ergebnisse der am Blute von 22 Nierengesunden ausgeführten Versuche zusammengestellt. Sie lassen sich sofort überblicken: *An Nierengesunden ist die Harnstoffkonzentration im Gesamtblute und im Serum, wie aus den Versuchen 1 bis 15 hervorgeht, die nämliche; und, wie aus Versuchen 16 bis 22 hervorgeht, auch am Plasma dieselbe, es kann also keine Rede davon sein, daß, wie Falta*

und Richter-Quittner[1]) *gefunden haben, die Blutkörperchen keinen Reststickstoff enthalten.* Die genannten Autoren äußern sich im Anschluß an ihre mit Traubenzucker ausgeführten Versuche[2]) wörtlich wie folgt: „... sich nur dann, wenn die Gerinnung vollständig verhindert oder vollständig herbeigeführt ist, die Werte im Plasma vollkommen mit denen im spontan geronnenen Serum decken ...“. Diese Bedingungen sind in meinen Versuchen 16 bis 22 restlos erfüllt und ist die Übereinstimmung im Harnstoffgehalt von Serum und Plasma eine vorzügliche. *Wenn nun dieselbe Harnstoffkonzentration auch im Gesamtblute angetroffen wird, so gibt es hierfür,* wie immer das Blut vorbehandelt wurde, *bloß eine einzige Erklärung: daß es nämlich keinen Unterschied in der Harnstoffkonzentration zwischen Plasma und roten Blutkörperchen gibt.* Würden die Blutkörperchen keinen oder auch nur weniger Harnstoff als das Plasma enthalten, so müßte selbstredend die Harnstoffkonzentration im Gesamtblute kleiner als im Plasma (oder im Serum) angetroffen werden. Auch der etwaige Einwand, daß der Harnstoff nachträglich in die lädierten Blutkörperchen hineindiffundiert wäre, widerlegt sich von selbst, da ja auch in diesem Falle die Harnstoffkonzentration im Gesamtblute abnehmen bzw. geringer als im Serum oder im Plasma hätte erscheinen müssen.

Auch der Umstand, daß ich die relativen Blutkörperchenvolumina stets unberücksichtigt lassen konnte und doch zu denselben Resultaten kam, spricht für die Richtigkeit meiner Ergebnisse. Denn nur in dem *einzigen* Falle, wenn die Harnstoffkonzentration in Plasma und in den Blutkörperchen die nämliche ist, sind die Volumina der letzteren für das Endergebnis belanglos; d. h. 100 Raumteile Blut, bestehend aus x Raumteilen Plasma und y Raumteilen Blutkörperchen, enthaltend je z Proz. Harnstoff, müssen stets eine Konzentration von z Proz. haben, welchen Wert immer wir für x und für y einsetzen.

B. Die am Blute von 11 Nierenkranken ausgeführten Untersuchungen führten zu etwas abweichenden Resultaten, die in Tabelle II zusammengestellt sind. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, erhielt ich im Gesamtblute mit einer einzigen Ausnahme stets etwas geringere Werte als im Serum bzw. im Serum und im Plasma. Die Unterschiede habe ich berechnet und in Tabelle III zusammengestellt.

Bei so geringen Ausschlägen würde ich vielleicht nicht anstehen, sie als aus unvermeidlichen Versuchsfehlern herrührend anzusehen; doch ist zu bedenken, daß es sich um 15 Bestimmungspaare (11 Bestimmungen am Gesamtblute, 11 am Serum und 4 am Plasma) handelt, von denen nur ein einziges Bestimmungspaar im Gesamtblute mehr Harnstoff ergab als im Serum.

---

[1]) *W. Falta* und *M. Richter-Quittner*, diese Zeitschr. **100**, 148.

[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **129**, 580.

Tabelle II.

Versuchsnummer	Datum des Versuches	An Nierenkranken Harnstoff mg in 100 ccm		
		Gesamtblut	Serum	Plasma
23	10 II. 1923	78,7	81,5	—
24	17. XI. 1922	84,5	85,8	—
		89,7	91,3	—
25	19. I. 1923	93,1	93,9	—
26	28. I. 1923	162,7	166,3	—
27	13. XI. 1922	234,5	258,7	—
28	15. XI. 1922	241,5	260,0	—
29	10. II. 1923	505,4	516,8	—
		1490,1	1554,3	—
	Mittelwerte .	**186,2**	**194,3**	—
30	22. III. 1923	47,4	49,2	48,9 (H)
31	26. IX. 1923	164,9	161,3	166,0 (P)
32	24. III. 1923	165,8	168,6	173,3 (H)
33	18. II. 1923	682,2	694,6	697,8 (H)
		1060,3	1073,7	1086,0
	Mittelwerte .	**265,1**	**268,4**	**271,5**

Tabelle III.

Versuchsnummer	Im Gesamtblut weniger (—) oder mehr (+) als im		Versuchsnummer	Im Gesamtblut weniger (—) oder mehr (+) als im	
	Serum Proz.	Plasma Proz.		Serum Proz.	Plasma Proz.
23	— 3,4	—	29	— 2,2	—
24	— 7,5	—	30	— 3,7	— 3,1
	— 1,7	—	31	+ 2,2	— 0,7
25	— 0,9	—	32	— 1,7	— 4,3
26	— 2,2	—	33	— 1,8	— 2,2
27	— 9,3	—			
28	— 7,1	—			

Ich weiß für diese Erscheinung keine bessere Erklärung als die, die den *Andresen*schen Befunden[1]) zugrunde liegen mag; allerdings nicht in dem von diesem Autor angenommenen Sinne einer gesetzmäßigen Verteilung des Harnstoffs zwischen Plasma und Blutkörperchen, wonach unter den von *Andresen* getroffenen Versuchsbedingungen die Harnstoffkonzentration im Plasma etwa das Dreifache der Konzentration in den Blutkörperchen betrüge.

Ohne auf das Problem der Durchgängigkeit der Blutkörperchen für Harnstoff hier eingehen zu wollen — da ja diese Arbeit bloß den Harnstoff*gehalt* der Blutkörperchen zum Vorwurf hatte —, muß ich

[1]) *K. L. Gad Andresen,* diese Zeitschr. **116**, 266.

diese Frage doch flüchtig berühren, indem ich mir den Unterschied in den Befunden an Nierengesunden und an Nierenkranken wie folgt zu erklären versuche.

An Nierengesunden ist der Harnstoffspiegel im Plasma, mit Ausnahme gewisser, der Nahrungsaufnahme folgender Perioden, ein konstanter, indem sich Harnstoffzufuhr (von den arbeitenden Zellen her) und Harnstoffabgabe (durch die Nieren gegen den Harn zu) das Gleichgewicht halten; dementsprechend haben die Blutkörperchen im Blute der Nierengesunden (die zwar nicht immer auf nüchternen Magen, doch stets ohne Eiweißnahrung genossen zu haben, von mir untersucht wurden), den Harnstoffgehalt des sie umgebenden Plasmas schon längst angenommen gehabt. Findet jedoch, wie in gewissen Nierenkrankheiten, oder in gewissen Stadien derselben, eine zunehmende Anreicherung des Plasmas an Harnstoff statt, so passen sich die Blutkörperchen der zunehmenden Harnstoffkonzentration des umgebenden Plasmas mit der Zeit zwar wieder an, doch bedarf es hierzu immerhin einer bestimmten Zeitdauer. Dieser Zeitverlust kann aber nicht eingebracht werden, wenn, wie dies noch am ehesten in meinen Fällen 27, 28, 29 und 33 angenommen werden kann, der Harnstoffgehalt des Plasmas inzwischen weiter zugenommen hat.

Allerdings ist es auch möglich, daß es sich um Unterschiede in der Löslichkeit des Harnstoffs — im wasserreicheren Plasma einerseits, in den wasserärmeren Blutkörperchen andererseits — handelt; und zwar um Unterschiede, die sich in meinen Fällen 27, 28, 29, 33 bemerkbar machen, da es sich hier um recht große Werte handelt, die von den unvermeidlichen Versuchsfehlern *nicht* verdeckt werden können; hingegen in den an Nierengesunden ausgeführten Versuchen 1 bis 22 unentdeckt bleiben und auch bleiben mußten, weil ja hier die Versuchsfehler zwar von derselben Größenordnung wie oben, jedoch offenbar größer sind als der etwaige Unterschied im Harnstoffgehalt von Plasma und Blutkörperchen. Diese Annahme würde zu der von *Andresen* angenommenen Verteilung führen, allerdings in einem ganz anderen Verhältnis, als von *Andresen* für diese Verteilung angenommen wird.

Untersuchungen über den Acetaldehydgehalt des Harns bei Gesunden und Kranken.

Von

Wilhelm Stepp und Irene Rothman-Manheim.

(Aus der medizinischen Klinik zu Gießen.)

(Eingegangen am 11. Februar 1924.)

Im Verlaufe von Untersuchungen über die reduzierenden Substanzen des Blutes bei Diabetikern machte *W. Stepp* vor einiger Zeit die Beobachtung, daß unter diesen zuweilen flüchtige Stoffe von Aldehydcharakter nachzuweisen sind[1]). Substanzen der gleichen Art finden sich, wie bald gezeigt werden konnte[2]), auch im Harne. Es gelang *Stepp* und *Feulgen*, durch Anwendung des von *Vorländer* entdeckten und von *C. Neuberg* zuerst zur Identifizierung von Aldehyden benutzten Kondensationsverfahrens mit *Dimethylhydroresorcin* („*Dimedon*" nach *Neuberg*) den exakten Nachweis zu führen, daß der flüchtige Aldehyd aus *Acetaldehyd* besteht[3]).

Schon vor der sicheren Identifizierung hatte *W. Stepp* die Vermutung ausgesprochen, daß es sich um Acetaldehyd handle, und es war der Versuch einer quantitativen Erfassung des Aldehyds unternommen worden[2]). Freilich standen dem nicht geringe Schwierigkeiten entgegen. Es ließ sich nämlich der flüchtige Aldehyd stets nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aceton nachweisen. Das der quantitativen Aldehydbestimmung dienende „*Bisulfit*"-*Verfahren* von *Ripper* konnte aber nicht ohne weiteres benutzt werden, da auch Aceton mit Bisulfit reagiert. Diese Tatsache an sich hätte kein unüberwindliches Hindernis bedeutet, da man den Aldehyd durch Oxydation (mit H_2O_2 nach *Shaffer*, mit Ag_2O nach *Friedmann* und *Embden*) leicht entfernen und danach feststellen konnte, welcher Teil der an Bisulfit gebundenen Stoffe dabei verschwand. Doch war die Voraussetzung für ein solches Vorgehen die, daß Aldehyd und Aceton gleich prompt mit Bisulfit reagierten. Das war indes nicht der Fall[4]).

---

[1]) *Stepp*, Zeitschr. f. phys. Chem. **107**, 29, 1919; diese Zeitschr. **107**, 60, 1920.

[2]) *W. Stepp* und *H. Lange*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **134**, 47, 1920.

[3]) *W. Stepp* und *R. Feulgen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, 301, 1921.

[4]) *Stepp* und *Engelhardt*, diese Zeitschr. **111**, 1920.

Aber auch der andere Weg, nämlich die Anwendung des Jodbindungsverfahrens, das die Grundlage der Acetonbestimmungsmethode nach *Messinger-Huppert* bildet, schien nicht ohne weiteres gangbar. Denn obwohl Aldehyde mit alkalischer Jodlösung unter Jodoformbildung reagieren, erfolgt dieser Vorgang bei weitem nicht so regelmäßig, sicher und rasch wie der analoge beim Aceton, so daß also das *Messinger-Huppert*sche Verfahren zur quantitativen Erfassung von Gesamtaceton + Aldehyd in der gewöhnlichen Form nach *Embden-Schmitz* nicht zu verwenden war[1]).

Nun hatten *v. Fürth* und *Charnaß* gezeigt, daß unter Einhaltung ganz bestimmter Bedingungen (hochgradige Verdünnung, tropfenweiser Zusatz der Jodlösung, starke alkalische Reaktion, niedrige Temperaturen) das Jodoformverfahren doch zur quantitativen Aldehydbestimmung brauchbar ist, und *Stepp* und *Engelhardt*[1]) konnten auf Grund eigener auf diesen Punkt gerichteter Untersuchungen im ganzen diese Anschauung bestätigen. Freilich, ideal war die Methode nicht, aber sie war die einzige, mit der man eine annähernde Vorstellung über den Gehalt einer Flüssigkeit an Aldehyd in Gegenwart von Aceton gewinnen konnte. Jedenfalls war es dem von *Jolles* modifizierten *Ripper*schen Bisulfitverfahren[1]), bei dem auch das Aceton quantitativ mitbestimmt werden kann, unbedingt vorzuziehen, da die dafür geforderten Bedingungen sehr umständlich sind und die Genauigkeit der Methode ganz von deren Einhaltung abhängt.

Um ein ungefähres Urteil darüber zu gewinnen, wie groß die in Diabetikerharnen auftretenden Aldehydmengen sein können, hatten wir bei einer Reihe von Fällen den Urin in der folgenden Weise untersucht.

Je nach Bedarf wurden 20 bis 100 ccm Harns nach Verdünnung mit der 7½fachen Menge Wassers mit einigen Kubikzentimetern 50proz. Essigsäure versetzt und in der für die Acetonbestimmung gebräuchlichen Weise destilliert. Das Destillat wurde mit frisch bereitetem Silberoxyd ½ Stunde am Rückflußkühler gekocht, dann am absteigenden Kühler destilliert und im Destillate das Aceton, das durch Silberoxyd nicht angegriffen wird, bestimmt. Der gefundene Wert ist auf *Gesamtaceton* (Aceton + Acetessigsäure) zu beziehen. In einer Kontrolle wird nach *Fürth* und *Charnaß* die Summe der jodbindenden Substanzen: *Aldehyd* + *Aceton* bestimmt. Die Differenz zwischen den beiden Werten stellt den auf *Aldehyd* entfallenden Anteil der Jodbindung dar. Bezüglich technischer Einzelheiten und der sehr zahlreichen Kontrollversuche sei auf die Arbeit von *Stepp* und *Lange* [2]) verwiesen.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen an einem größeren Material von Diabetikern fanden wir zu unserer Überraschung in manchen Fällen eine sehr starke Beteiligung der Aldehydfraktion an der Jodbindung. Der auf Aldehyd entfallende Anteil der Jodbindung betrug im Durchschnitt ¼ bis $^1/_{10}$ der Gesamtwerte, ja in einzelnen Fällen stieg er fast bis zur Hälfte.

---

[1]) *Stepp* und *Engelhardt*, diese Zeitschr. **111**, 1920.
[2]) *W. Stepp* und *H. Lange*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **134**, 47, 1920.

Irgendwelche festen Beziehungen zwischen Aldehydausscheidung und Acidosis oder Blutzuckerkurve konnten wir damals nicht feststellen, indes schien es uns, daß die Aldehydurie eher im Beginn der Acidosis als auf deren Höhe stärker ausgesprochen war.

Die Wichtigkeit der Befunde erforderte dringend die Weiterführung der Untersuchungen an einem umfassenderen Material, wenn möglich mit einer besseren, exakter arbeitenden Methode. Denn als absolut zuverlässig konnten die erhaltenen Werte nicht angesprochen werden.

Nachdem im Jahre 1921 *Stepp* und *Fricke* ein genau arbeitendes Verfahren der quantitativen Aldehydbestimmung in Gegenwart von *Aceton* ausgearbeitet hatten[1]), war die Möglichkeit gegeben, die Ausscheidung des Acetaldehyds im Harne Gesunder und Kranker erneut zu studieren; hatten doch inzwischen *Stepp* und *Feulgen* den Acetaldehyd auch aus *normalem* Harne als *Dimedon*produkt isolieren können[2]).

Im folgenden sei eine kurze Übersicht über die Ergebnisse der in den letzten Jahren an einem größeren Material vorgenommenen Untersuchungen gegeben, deren Veröffentlichung sich leider aus äußeren Gründen sehr stark verzögert hat.

Zur Methodik.

Zu dem von *Stepp* und *Fricke* ausgearbeiteten „Silber"-Verfahren[1]) hat *Fricke* später noch ergänzende methodische Mitteilungen gemacht, auf die wir ausdrücklich verweisen[3])[4]). Hier sei nur hervorgehoben, daß sich die *Wasserdampfdestillation* an Stelle der gewöhnlichen Destillation ganz besonders bewährt hat und viel Zeit erspart. Weiter sei betont, daß in Fällen, wo infolge sehr geringer Aldehydmengen das Silber sich in kolloidalem Zustande ausschied und zur Bildung roter bis brauner Lösungen führte, durch Zusatz von *Kaolin* das Silber doch noch zur Ausfällung gebracht und die Bestimmung gerettet werden kann (*B. Behrens*).

Von größter Wichtigkeit ist es, bei Untersuchungen des Harns auf Acetaldehyd *sich zu versichern*, daß *nicht etwa Urotropinpräparate angewendet worden sind. Da nämlich Formaldehyd Silberoxyd genau so reduziert, wie Acetaldehyd, können ganz grobe Täuschungen entstehen. W. Stepp* hat vor kurzem auf diese Tatsache unter Ausführung eines bezeichnenden Beispiels nachdrücklich aufmerksam gemacht[5]). In Zweifelsfällen kann man ohne Schwierigkeiten eine Entscheidung treffen durch Darstellung des Dimedonproduktes[6])[4]).

---

[1]) *Stepp* und *Fricke*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 293, 1921.

[2]) *Stepp* und *Feulgen*, ebendaselbst **119**, 72, 1922.

[3]) *R. Fricke*, ebendaselbst **118**, 241, 1922.

[4]) *W. Stepp*, Die Methodik der Bestimmung des Acetaldehyds im Harn. Handb. d. biol. Arbeitsmethoden (*Abderhalden*), Abt. IV, Teil 5, S. 251.

[5]) *W. Stepp*, diese Zeitschr. **130**, 578, 1922.

[6]) *W. Stepp* und *R. Feulgen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, 301, 1921.

Ergebnisse der Untersuchungen an Gesunden und Kranken.

Um einen sicheren Einblick in die Ausscheidungsverhältnisse des Acetaldehyds zu bekommen, haben wir großes Gewicht auf die regelmäßige quantitative Bestimmung während längerer Zeitperioden gelegt. So haben wir — um nur ein paar Fälle zu nennen — bei manchen Patienten die Untersuchungen bis auf 5 Wochen ausgedehnt, wobei nicht ein einziger Tag für die Untersuchung ausfiel.

Das Material umfaßt etwa 50 Fälle, an denen rund 700 bis 800 Einzelbestimmungen ausgeführt wurden.

Da jedesmal ein Teil des 24-Stunden-Harns verarbeitet wurde, um die Gesamttagesmenge des Acetaldehyds erfahren zu können, mußte man natürlich mit der Möglichkeit rechnen, daß unter Umständen bakterielle Gärungsvorgänge zu Acetaldehydbildung und damit zu einer Trübung unserer Resultate führen könnten; wissen wir doch durch die Arbeiten *C. Neubergs* und seiner Mitarbeiter, daß ebenso wie andere Mikroorganismen auch *Bacterium coli* Acetaldehydbildung hervorrufen kann.

Indes scheint diese Gefahr bei unseren Untersuchungen wohl kaum eine größere Rolle gespielt zu haben, da die dabei erhaltenen mittleren Werte von denen, die wir bei früher untersuchten Fällen im steril mit dem Katheter entnommenen und sofort verarbeiteten Harne gefunden hatten, kaum wesentlich abweichen.

Immerhin wollten wir auf diesen Punkt doch aufmerksam machen, denn es könnte ja sein, daß kleinere Schwankungen in den Werten auf diese Weise vielleicht eine Erklärung fänden. Je nach Bedarf wurden von dem Tagesharn 500 bis 1000 ccm verarbeitet. Bei Verwendung kleinerer Mengen wäre die Bestimmung infolge des meist geringen Aldehydgehaltes zu ungenau geworden.

Einige Untersuchungen an gesunden Menschen.

Wie wir schon früher festgestellt hatten, wurden im 24stündigem Tagesharn einige Milligramme Acetaldehyd ausgeschieden. Die Mittelwerte liegen zwischen 2 und 4 mg, doch finden sich nicht selten erhebliche Abweichungen davon sowohl nach oben wie nach unten.

Inwieweit bei diesen Schwankungen die Aufnahme alkoholischer Getränke eine Rolle spielt, ließe sich mit Sicherheit nur durch besondere auf diesen Punkt gerichtete Untersuchungen feststellen. Daß nach Zufuhr von Äthylalkohol Acetaldehyd in deutlicher nachweisbarer Menge auftritt, war von *Stepp* schon vor längerer Zeit gezeigt worden[1]).

Nachdem wir also ein ungefähres Urteil über die Acetaldehydausscheidung beim Gesunden unter normalen Verhältnissen gewonnen hatten, schien es uns von Wichtigkeit, den Einfluß von zwei Faktoren zu studieren, deren Einwirkung auf den Stoffwechsel gut bekannt ist, nämlich den Einfluß der *Kohlehydratentziehung* und den des *Hungers*.

---

[1]) *Stepp*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 87, 148, 1920.

Kohlehydratentziehung.

Tabelle I.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge ccm	Verarbeitete Harnmenge ccm	Verbrauchte Silbermenge in n/10 $AgNO_3$ ccm	Acetaldehyd in mg und 24 Std.	Bemerkungen
1	1160	500	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Gemischte Kost
2	1220	500	1,50	8,0	„ „
3	1000	500	0,55	2,42	„ „
4	2120	475	1,16	**11,9**	Kohlehydratfreie Kost
5	1120	500	0,32	**1,58**	„ „
6	1500	465	0,38	**2,58**	„ „
7	1300	500	0,73	4,13	Gemischte Kost
8	1500	400	0,28	2,64	„ „
9	1200	500	fehlt	fehlt	„ „
10	1500	500	0,75	6,6	„ „
11	1800	450	1,15	10,12	„ „

Die Versuchsperson war eine gesunde Frau von 32 Jahren, bei der eine gewisse Adipositas bestand.

Vom 11. bis 13. März 1922 einschließlich erhielt sie strenge Diabetikerkost, das bedeutet völligen Ausschluß der Kohlehydrate.

Irgend ein Einfluß dieser Maßnahme war in dem Versuche nicht zu erkennen. Dem Ansteigen des Aldehydwertes am ersten kohlehydratfreien Tag auf 11,9 mg vermögen wir eine besondere Bedeutung nicht beizumessen, da an den nächsten beiden Tagen sehr geringe Werte zu verzeichnen sind, und sowohl an den Vortagen wie an den Nachtagen die Schwankungen sehr groß sind.

Aus Mangel an geeignetem Material und aus anderen Gründen konnte ein derartiger Versuch nicht mehr wiederholt werden.

Hungerversuch.

Den Versuchen unterzog sich Herr Kollege *Lendle* im Verlaufe von umfangreichen Studien über die Acetaldehydausscheidung im Harn von Kranken[1]).

Tabelle II.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Acetaldehyd in mg und 24 Std.	Gesamtaceton in mg und 24 Std.	Bemerkungen
1	1350	4,46	0	
2	1480	5,70	0	
3	900	2,48	0	
4	1150	**5,41**	**400,84**	*Hungertag*
5	2030	3,35	0	
20	1100	3,92	0	
21	1500	4,95	0	3 × 1,0 Diuretin
22	1100	2,72	fehlt	
23	750	**8,06**	**264,6**	*Hungertag*
24	600	3,96	0	

[1]) Inaug.-Diss. Gießen 1923; der Arbeit des Herrn *Lendle* sind außer diesem Versuche noch einige später aufgeführte Beobachtungen entnommen.

Auch bei diesem Versuche ist irgend eine Besonderheit in der Aldehydausscheidung nicht zu erkennen. Diesem negativen Befunde kommt deswegen eine besondere Bedeutung zu, weil aus ihm zu ersehen ist, daß *die Aldehydausscheidung anscheinend mit der Acetonkörperbildung nichts zu tun hat.* Denn obwohl diese an den beiden Hungertagen sehr ausgesprochen ist, ist von einem Ansteigen der Aldehydwerte nichts zu bemerken. Wir kommen auf die fraglichen Beziehungen zwischen Aldehydurie und Acidosis später bei Besprechung der untersuchten Diabetesfälle noch zurück.

Untersuchungen an Kranken.

Nichtdiabetiker.

In dem Material von nichtdiabetischen Kranken, das wir untersuchten und das alle möglichen Krankheiten umfaßt, haben wir den Nieren- und Leberkrankheiten unsere besondere Aufmerksamkeit zugewendet.

Nierenerkrankungen.

Bei drei Fällen von *genuiner Nephrose*, von denen zwei länger als 10 (12 und 14) Tage beobachtet wurden, lagen die täglichen Durchschnittswerte nahe bei 1 mg; die höchste überhaupt gefundene Zahl war 2,4.

Ähnliche niedrige und wenig schwankende Zahlen fanden wir auch bei *Nephritiden.* Unter ihnen waren zwei Fälle von Schrumpfniere mit starker Azotämie. Die Werte liegen hier gleichfalls zwischen 1 und 2 mg. Die Diurese war zu der Zeit, zu der die Untersuchungen ausgeführt wurden, leidlich, d. h. es bestand nicht etwa eine Oligurie, und zwar gilt das sowohl für die Nephrosen wie für die Nephritiden. Nur bei dem einen Nephritisfall kam es mit der Entwicklung einer Pneumonie zum Ausbruch *urämischer Symptome*, unter denen die Patientin zugrunde ging; hier war am Schlusse eine ausgesprochene Oligurie vorhanden, ohne daß jedoch die Aldehydmenge sich noch weiter verringert hätte.

Und die gleiche Beobachtung konnte bei einer anderen Patientin gemacht werden, die ebenfalls an *Urämie* zugrunde ging.

Die geringe Aldehydausscheidung bei den chronischen Nephritiden hat uns besonders deswegen interessiert, weil *Stepp* gelegentlich seiner ersten Untersuchungen über flüchtige Aldehyde im *Blute* gerade bei *Nierenkranken* eine Vermehrung gefunden zu haben glaubte[1]). Wir haben daher bei der einen Patientin das Blut einige Tage vor dem Exitus auf Acetaldehyd quantitativ untersucht und *in 100 ccm Gesamtblut 1,81 mg* gefunden. *In 100 ccm Blut war also so viel Aldehyd enthalten wie im Tagesharn.* Dieser Befund steht übrigens im Einklang mit den Verhältnissen beim Gesunden; auch hier übersteigt der Gehalt des Blutes an Acetaldehyd den des Harns ganz beträchtlich. Wie schon früher von *Stepp* gezeigt werden konnte, enthält das normale Blut 2 bis 3 mg Acetaldehyd in 100 ccm. Bei unserem Falle von *Urämie* lag also *keine Vermehrung* vor.

Ikterus, Lebererkrankungen.

Bei den von uns untersuchten Fällen von Erkrankungen der *Leber-* und der *Gallenwege*, wobei einzelne über 2 Wochen täglich kontrolliert wurden, konnten *keine Abweichungen von der Norm* festgestellt werden. Die Mittelwerte lagen hier zwischen 1,5 und 2 mg in 24 Stunden.

---

[1]) *Stepp*, diese Zeitschr. **107**, 60, 1920.

Diabetes insipidus.

Eine ganz ausgesprochene Erhöhung der Aldehydwerte sahen wir bei zwei Fällen von *Diabetes insipidus*; bei dem einen Falle wurden Mengen bis zu **15,9**, bei dem anderen bis zu **27,2 mg** in 24 Stunden festgestellt. Diese Erkrankung konnte uns insofern wichtige Aufschlüsse liefern, als hier der *Einfluß der Diurese* auf die Aldehydausscheidung hervortreten mußte. Und in der Tat, die ausschwemmende Wirkung der Diurese ist unverkennbar vorhanden. Der prozentuale Gehalt des Harns an Acetaldehyd ist nicht, wie man vielleicht hätte denken können, vermindert. Er war merkwürdigerweise im Gegenteil sogar erhöht, so daß also die stärkere Aldehydurie beim Diabetes insipidus nicht allein durch die erhöhte Diurese erklärt werden kann.

Tabelle III.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Acetaldehyd in mg/Prom.	Acetaldehyd in mg und 24 Std.	Bemerkungen
1	7 350	0,88	**6,47**	
2	9 050	1,479	**13,33**	
3	7 200	2,104	**15,15**	
4	7 200	2,209	**15,90**	
5	6 500	0,99	**6,43**	
6	6 750	1,32	**8,91**	
7	7 500	0,374	**2,80**	
8	6 800	0,88	**5,98**	
9	11 052	0,77	**8,51**	
10	7 700	1,276	**9,82**	
11	7 570	0,836	**6,33**	Novasurol
12	7 700	1,76	**13,55**	Pituglandol
14	11 000	0,77	**8,47**	

Tabelle IV.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Acetaldehyd in mg/Prom.	Acetaldehyd in mg u. 24 Stunden	Bemerkungen
1	11 000	1,562	**17,18**	Melubrin
3	13 000	1,606	**20,87**	
4	9 510	1,76	**16,73**	
5	8 650	3,146	**27,21**	
6	5 800	0,77	**4,46**	
7	2 340	1,65	**3,86**	
8	1 300	2,2	**2,86**	
11	760	1,65	**1,65**	
12	1 100	1,43	**1,57**	Melubrin 3 × 0,5
13	2 000	0,88	**1,76**	„ 3 × 0,5
14	1 000	1,54	**1,54**	„ 3 × 0,5
15	2 500	1,1	**2,75**	„ 3 × 0,5
18	2 000	0,77	**1,54**	
19	2 275	0,88	**2,00**	
21	2 300	5,368	**12,35**	
22	1 250	1,584	**1,98**	

Zu *Tabelle III* wäre zu bemerken, daß auch hier die Aldehydmengen ebenso wie unter normalen Verhältnissen von Tag zu Tag große Schwankungen aufweisen. An dem Tage, an dem *Pituglandol* verabreicht wird, steigt die Aldehydkurve steil an, doch waren 10 bis 12 Tage vor dem Pituglandolversuch noch höhere Zahlen zu verzeichnen. Eine besondere Bedeutung kann also dem Befunde nicht beigemessen werden.

Bei dem Falle von *Tabelle IV*, der als *induzierter hysterischer Diabetes insipidus* aufgefaßt werden muß, finden sich noch höhere Aldehydzahlen. Auch hier spielt nicht nur die Ausschwemmung, sondern auch die höhere Aldehydkonzentration eine Rolle.

Verschiedene andere Krankheiten.

Von anderen Krankheitsfällen, bei denen längere Zeit die Aldehydausscheidung kontrolliert wurde, seien genannt: *Verschiedenartige Herzerkrankungen*, *Tuberkulose* der Lungen und anderer Organe, *Arteriosklerose*, *Tumoren* (Carcinome und Sarkome), *Granulome*, *perniziöse Anämie*, *Ulcus ventriculi* und *fieberhafte Krankheiten* (Sepsis, Pneumonien usw.).

Bei keinem einzigen dieser Fälle konnte eine wesentliche Abweichung der Mittel-, Minimal- und Maximalwerte von der Norm festgestellt werden. Wir wollen deshalb auf die Wiedergabe dieser Befunde verzichten.

Diabetiker.

Wie schon oben ausführlich dargelegt wurde, hatten *Stepp* und *Lange*[1]) bei Diabetikern in einzelnen Fällen erstaunlich hohe Aldehydwerte im Harn gefunden; freilich war die Methode, auf die man damals angewiesen war, nicht sehr befriedigend. Nach Ausarbeitung der „Silbermethode" von *Stepp* und *Fricke*[2]) hatten wir daher die Untersuchungen an Diabetikern alsbald neu aufgenommen.

Wir möchten gleich feststellen, daß in dem Material, das uns seitdem zur Verfügung stand, Fälle mit derartig hohen Aldehydzahlen nicht zur Beobachtung kommen, obwohl bei einer ganzen Reihe von Kranken Werte verzeichnet wurden, die ein Vielfaches der Normalzahlen darstellen. Auch diesmal fanden sich die höchsten im Laufe der gesamten Untersuchungen überhaupt beobachteten Werte beim Diabetes mellitus. Die Tatsache, daß bei dieser Erkrankung eine Acetaldehydausscheidung im Harne vorkommt, die ohne weiteres nachzuweisen ist, wird also auch durch die Anwendung der neuen einwandfreien Methode nur bestätigt. Der Beweis, daß es sich dabei wirklich um Acetaldehyd handelt, wurde ja übrigens, wie schon erwähnt, durch Darstellung des Kondensationsproduktes mit „Dimedon" einwandfrei erbracht.

Daß nicht in jedem Falle von Diabetes mellitus Acetaldehyd in vermehrter Menge im Harn aufzutreten braucht, hatten schon *Stepp* und *Lange* gezeigt. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung sahen wir auch jetzt Fälle, wo die Werte ganz innerhalb der Zahlen lagen, denen wir bei normalen Menschen begegnen, d. h. *Mittelwerte von 1,5 bis 3 bis 5 mg* mit einem Maximum von etwa 8 mg. Da diese Fälle hier nicht im einzelnen wiedergegeben werden sollen, so sei nur bemerkt, daß es sich hier meist um Fälle von *leichtem Diabetes* handelt mit nur mäßiger Glykosurie und fehlender bis höchstens mittelstarker Acidosis.

---

[1]) Vgl. die Fußnote 2, S. 349.

[2]) Vgl. die Fußnoten 1 und 3, S. 351.

Die höchsten Aldehydwerte finden sich bei schwerem Diabetes, während merkwürdigerweise gerade bei maximaler Acidosis und im Coma normale oder kaum erhöhte Zahlen festzustellen sind.

Besondere Aufmerksamkeit haben wir der Frage zuteil werden lassen, ob und inwieweit die zur Behandlung des Diabetes notwendigen Maßnahmen die Aldehydurie selbst beeinflussen oder sich bei der Aldehydbestimmung geltend machen. Daneben war eine eventuelle Beziehung der Aldehydurie zur Blutzuckerkurve, zur Glykosurie und, wie schon hervorgehoben, zur Acidosis zu beachten. Wir verfolgten daher

1. Blutzucker und Aldehydurie,
2. Glykosurie und Aldehydurie,
3. Acetonkörperausscheidung und Aldehydurie,
4. den Einfluß strenger Diät,
5. „ „ der Haferkur,
6. „ „ von Alkalizufuhr.

Bei diesem letzteren Punkt war zu berücksichtigen, daß *stärkere alkalische Reaktion des Harns infolge reichlicher Aufnahme von Natriumbicarbonat unter Umständen zu Aldehydverlusten führen konnte;* wissen wir doch, wie empfindlich aliphatische Aldehyde gegen alkalische Reaktion sind!

Daß die unter 1. bis 3. aufgeführten Beziehungen durch die in Ziffer 4. bis 6. genannten Maßnahmen beeinflußt werden, braucht nicht besonders betont zu werden. Wir hielten es für zweckmäßig, die einzelnen Gesichtspunkte getrennt aufzuführen.

Was zunächst die Störung des Zuckerstoffwechsels anlangt, die sich am deutlichsten in der *Blutzuckerkurve* ausdrückt, so haben wir den Eindruck, *daß geringe Grade von Hyperglykämie, wobei ja auch meist die Glykosurie bescheidener ist, auch keine verstärkte Aldehydurie* zeigen.

Vermehrte Aldehydmengen zeigen sich in der Regel nur *bei stärkerer Hyperglykämie,* bei denen *gleichzeitig eine erheblichere Ketonurie* besteht. Doch konnten wir keinerlei feste Beziehungen zwischen diesen einzelnen Erscheinungen feststellen. In mehreren Fällen hatten wir den Eindruck, daß insofern ein gewisses Zusammengehen bestand, als eine Erhebung der *Acetonkörperkurve* gefolgt war von einem Ansteigen der Aldehydkurve; bei der letzteren waren freilich stets die uns schon vom Gesunden her bekannten starken täglichen Ausschläge vorhanden, die beim Gesamtaceton niemals in der gleichen Weise nachzuweisen sind. Es ist daher wichtig, daß man von diesen Tagesschwankungen abstrahiert und nur auf die allgemeine nach oben oder unten gehende Tendenz der Werte achtet.

Freilich, eine durchgehende Regel bildete dieses Verhalten nicht.

Die *Ausschaltung der Kohlehydrate* aus der Nahrung hatte bei den Diabetikern ebensowenig Einfluß auf die Aldehydausscheidung wie in dem analogen Versuch bei einer gesunden Frau, über den oben berichtet wurde.

Nicht ganz eindeutig liegen die Verhältnisse bei der *Haferkur.* In einigen Fällen steigt mit dem Beginn der Kur die Aldehydkurve an, so daß man an eine bestimmte Abhängigkeit der Aldehydausscheidung von der besonderen Ernährung denken könnte. In anderen Fällen fehlt freilich ein solches Zusammengehen ganz.

Bezüglich der *Alkalizufuhr* ließ sich ein Einfluß auf die Aldehydausschaltung nicht erkennen. Die Beobachtungen bei einer größeren Zahl

von Fällen geben auch hier ein wechselndes, feste Beziehungen nicht erkennen lassendes Bild.

Zur Erläuterung des Gesagten mögen ein paar Fälle dienen. Alle Einzelheiten sind den Tabellen zu entnehmen.

Tabelle V.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Reaktion	Zucker in g und 24 Stunden	Gesamtaceton in g u. 24 Std.	Acetaldehyd in mg und 24 Stunden	Bemerkungen
1	1300	sauer	36,4	1,52	12,87	Blutzucker, 0,311 Proz., 1. bis 5. Versuchstag 15 g Alkali und gemischte Kost.
2 [1])	3000	"	69,0	3,34	9,9	
3	4500	neutral	112,5	5,85	33,84	
4	2800	"	95,2	3,26	6,16	
5	3600	sauer	28,8	3,55	19,80	
6	4200	"	67,2	2,39	16,17	Hafertag
7	4200	"	58,8	1,76	32,34	"
8	2400	"	24,0	0,77	15,84	Gemüsetag
9	3100	"	15,5	1,31	22,16	"
10	4200	"	25,2	1,60	43,89	
11	4700	"	37,6	2,16	15,51	20 g Alkali
12	3000	"	21,0	2,36	16,50	20 g "
13	3500	"	31,5	3,02	13,48	20 g "
14	3000	alkalisch	27,0	2,07	8,25	20 g "
15	4000	"	36,0	2,42	24,2	15 g "
16	3200	neutral	38,4	2,65	22,88	15 g "
17	4600	"	46,0	2,89	30,36	
18	4000	"	68,0	1,32	6,6	Hafertag
19	3700	"	55,5	0,68	12,21	"

In dem Falle von Tabelle V handelt es sich um einen mittelschweren bis schweren Erkrankungszustand mit stark ausgesprochener Aldehydurie. Wenn wir uns erinnern, daß die Mittelwerte der Norm bei etwa 2 bis 4 mg liegen, so sind demgegenüber die Zahlen zwischen 20 und 40 mg doch als ausgesprochen erhöht anzusehen. Die Aldehydkurve zeigt keinerlei Beziehungen zur Glykosurie und zur Acetonurie und auch keine zu diätetischen Maßnahmen.

Tabelle VI.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Reaktion	Zucker in g und 24 Stunden	Gesamtaceton in g u. 24 St.	Acetaldehyd in mg u. 24 St.	Bemerkungen
1	3000	sauer	120	4,1	?	Gemischte Kost, 10 g Alkali
2	4050		121,5	4,80	13,36	10 g "
3 [2])	4600		165,6	7,50	5,06	20 g "
4	3800		83,8	9,15	8,36	30 g "
5 [3])	4100		106,0	9,80	9,02	40 g "
6 [4])	(2100)		?		3,46	25 g "

Am 5. Versuchstage 500 ccm Natriumbicarbonat intravenös, ebenso am 6. Versuchstage, dazu noch Lävulose.

[1]) 60 g Brot, am 3. Versuchstag 100 g Brot.

[2]) Am dritten Versuchstage Blutzucker: 0,318 Proz.

[3]) Plötzliches Auftreten von Coma.

[4]) Ausgesprochenes Coma. Exitus letal.

In einem auffälligen Gegensatze zu dem Falle von Tabelle V steht der in Tabelle VI wiedergegebene. Hier handelt es sich um einen am sechsten Untersuchungstage im Coma zugrunde gehenden Patienten. Das Gesamtaceton steigt am Tage vor dem Tode auf 9,8 g. Die Aldehydausscheidung ist nur ganz wenig gesteigert.

Einen ganz ähnlichen Befund konnten wir bei einem anderen Falle erheben, der kurz nach seiner Einlieferung in die Klinik im Coma starb. Auch hier lag der Aldehydwert des Harns in fast normalen Grenzen.

Daß eine maximale Acidosis meist mit geringeren Aldehydwerten einhergehen kann und häufig einhergeht, dafür diene als weiterer Beleg der folgende in Tabelle VII wiedergegebene Fall.

Tabelle VII.

Versuchstag	Harn, Tagesmenge in ccm	Reaktion	Zucker in g und 24 Stunden	Gesamtaceton in g u. 24 St.	β-Oxybuttersäure in g u. 24 St.[1]	Acetaldehyd in mg u. 24 St.	Bemerkungen
1	2000	neutral	56,0	4,1	14,06	4,95	Hafertag, 40 g Alkali
2	1800	"	27,0	3,51	15,39	4,68	Gemüsetag, 40 g Alkali
3	1675	"	16,75	3,91	14,4	5,87	Gemüsetag, 40 g Alkali
4	1850	"	9,25	3,33	10,36	5,55	Gemüsetag, 30 g Alkali
5	1550	alkalisch	23,25	2,41	9,92	3,72	
6	2875	neutral	fehlt	4,16	19,66	6,31	
7	2600	alkalisch	44,2	4,0	16,51	6,24	
9	1800	"	23,4	1,0	3,15	3,24	
13	3150	neutral	19,0	3,93	14,8	5,67	

Hier sind neben den Zahlen für Gesamtaceton noch die Zahlen für die β-Oxybuttersäure angegeben[1]). Wie man sieht, handelt es sich um eine sehr starke Acidosis. Die Aldehydwerte sind hier nur unwesentlich erhöht.

Diese Beobachtung, die immer wieder bestätigt werden konnte, daß bei maximaler Acetonkörperbildung die Acetaldehydausscheidung normal oder nur ganz unwesentlich gesteigert ist, kann wohl kaum anders gedeutet werden, als daß die Acetaldehydbildung in keinerlei engeren Beziehungen zu dem Auftreten der Ketonkörper steht.

Freilich darüber muß man sich klar sein, daß die kleinen Mengen von Acetaldehyd, die überhaupt zu fassen sind, nichts ahnen lassen von der großen Bedeutung, die diesem Stoffe im intermediären Stoffwechsel zukommt. Erst das von *Neuberg* und *Färber*[2]) inaugurierte Abfangverfahren hat es ermöglicht, von den gewaltigen Mengen, die im Zellstoffwechsel intermediär entstehen und sofort wieder weiterverarbeitet werden, einen Begriff zu bekommen; wenigstens gilt das für den Zuckerstoffwechsel der Hefe. Aber es ist wohl kein Zweifel, daß die Rolle, die der Acetaldehyd im tierischen Stoffwechsel spielt, keine

---

[1]) Die β-Oxybuttersäurewerte verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Dr. *Gisevius*.

[2]) *Neuberg* und *Färber*, diese Zeitschr. 78, 238, 1916; vgl. auch *C. Neuberg*, Chem. Ber. **105**, 3624, 1922.

geringere ist. So haben kürzlich *Neuberg* und *Gottschalk*[1]) in der Meerschweinchenleber Acetaldehyd nachweisen können, nachdem schon vorher *Hirsch*[2]) im *Neuberg*schen Institut den gleichen Stoff aus der überlebenden Muskulatur von Rana esculenta, von der Schleie und vom Karpfen in wägbaren Mengen als Dimedonprodukt isoliert hatte.

Welche Bedeutung unseren Befunden für ein tieferes Verständnis des intermediären Stoffwechsels beim Diabetes mellitus beizumessen ist, müssen weitere Forschungen zeigen.

---

[1]) *Neuberg* und *Gottschalk*, Klin. Wochenschr., 2. Jahrg., Nr. 31, 1923.
[2]) *Hirsch*, diese Zeitschr. **184**, 415, 1923.

Mikrobestimmung von Methylalkohol im Blute.

Von

Nils V. Bildsten.

(Medizinisch-chemisches Institut Lund.)

(Eingegangen am 12. Februar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Widmark (1), der eine Mikromethode zur Bestimmung von Äthylalkohol im Blute ausgearbeitet hat, machte mir den Vorschlag, diese zur Bestimmung von Methylalkohol im Blute zu verwenden zu versuchen.

Die Methode, der die Oxydation des Alkohols mit Bichromat zugrunde liegt, wurde früher von *Nicloux* (2) für Methylalkohol benutzt. Das Verhältnis zwischen verbrauchtem Bichromat und Alkohol wird durch eine empirisch ermittelte Konstante ausgedrückt, und das Wesentliche bei der Anwendung der Methode für Methylalkohol ist die Bestimmung dieser Konstanten. Im übrigen wurden an der von *Widmark* ausgearbeiteten Methode keine größeren Veränderungen vorgenommen. Zur Orientierung über diese Methode in ihrer Gänze sei auf oben zitierte Arbeit von *Widmark* verwiesen; hier sollen nur einige kleinere technische Verbesserungen mitgeteilt werden.

I. Methodik.

Die meisten Einzelheiten der Methode wurden durchgeprüft, um zu sehen, ob es notwendig sei, mehr durchgreifende Veränderungen vorzunehmen. So wurden z. B. die zweckmäßigste Art für das Abmessen der Bichromat-Schwefelsäuremischung ermittelt, die Gefahr der Verdunstung von Methylalkohol beim Aufnehmen in die Abwägepipette und Wägen, sowie die Zeit der Wasserbadbehandlung usw. geprüft. Für einige dieser Einzelheiten hat es sich zur Erzielung guter Resultate und Erleichterung der Arbeit als vorteilhaft erwiesen, an der von *Widmark* ausgearbeiteten Methode einige Veränderungen vorzunehmen.

A. Das Abmessen der Bichromat-Schwefelsäuremischung.

Wie *Widmark* erwähnt, beruht die Genauigkeit der Methode vor allem darauf, daß man in jeden Kolben eine möglichst gleich große Menge Bichromatschwefelsäure einführt. Aus diesem Anlaß hat er

auch Vorschriften zur Abmessung der Lösung gegeben, die bei den von ihm und *Jeppsson* ausgeführten Versuchen gute Werte ergaben. Auch *Olow* (3) richtete seine Aufmerksamkeit auf diese Fehlerquelle, die bei der Beschickung der Kolben zutage tritt; er hat ein Verfahren zum Auspipettieren angegeben, wodurch es ihm gelingt, die Größe der Fehler herabzudrücken.

Bei der Benutzung einer Pipette zum Abmessen und Einführen des Bichromats habe ich gefunden, daß eine Pipette, an der die Stelle mit der Kalibriermarke durch Zusammenschmelzen des Glases enger gemacht wurde, verhältnismäßig gute Resultate liefert. Der Gehalt der Pipette wird durch das Zusammenschmelzen allerdings etwas verringert, dies ist jedoch für die Resultate ohne Belang, da bei jeder Bestimmung gleichzeitig Blindproben ausgeführt werden. Der Zerbrechlichkeit des Glases halber ist es angezeigt, die Pipette durch zwei Holzstäbchen von ungefähr Zündholzgröße zu verstärken.

Trotz genauen Arbeitens schwankten die Mengen auspipettierter Bichromat-Schwefelsäure. Dieser Fehler beruht ohne Zweifel darauf, daß beim Herausnehmen der Pipette aus der Säure diese die Außenseite derselben benetzt. Die hier haftenden Mengen sind verschieden, je nachdem man die Pipette mehr oder weniger tief in die Flüssigkeit eingetaucht hat. Es wurde auch versucht, die Pipette mit kleinen Lappen ausgewaschener, nicht fasernder Gaze abzutrocknen; aber auch dann wurden schlechte Werte erhalten.

Unter Berücksichtigung der gemachten Erfahrungen wurde nun aus sogenanntem Thermometerrohr mit einem inneren Durchmesser von 0,7 mm eine 1-ccm-Pipette hergestellt. Diese war leicht einzustellen und konnte, nachdem dies geschehen und überschüssige Flüssigkeit von der ausgezogenen Spitze abgestrichen, in wagerechter Lage gehalten werden, so daß der untere Meniskus ins Rohr hineinglitt, worauf die Pipette abgetrocknet wurde. Die besten der bisher erhaltenen Werte wurden mit dieser Pipette erzielt. Infolge der großen Viskosität der Bichromat-Schwefelsäuremischung lief die Pipette indessen äußerst langsam aus, weshalb ich die Pipette des großen Zeitverlustes halber als ungeeignet betrachtete, wenigstens zur Benutzung bei Serienbestimmungen.

Bessere Resultate wurden bei der Verwendung einer Mikrobürette nach *Bang* erhalten, da hier die früher erwähnte Fehlerquelle vermieden wird. Durch langsames Abfließenlassen der Bürette und Feineinstellung nach 1 Minute langem Warten wurden Blindwerte erzielt, die zu 80 Proz. einen geringeren als 0,01 ccm n/200 Thiosulfatlösung entsprechenden Fehler zeigten. Ein Nachteil ist der, daß der letzte Tropfen mitunter an der Bürettenspitze haften bleibt. Mit einem in eine haarfeine Spitze ausgezogenen Glasstabe kann dieser aufgefangen und dann mit Leichtigkeit in den Kolben eingeführt werden.

B. Die Destillation.

Widmark empfiehlt, auf die Oberseite des Pfropfens der Destillierkolben einen Tropfen destillierten Wassers zu geben, der dann auf

Grund der Kapillarkraft eingesaugt wird und den Schliff abdichtet. Bei meinen Versuchen hat es sich gezeigt, daß dies überflüssig — unter der Voraussetzung, daß der Pfropfen vollständig schließt — und unter gewissen Umständen sogar unvorteilhaft ist.

Es ist nämlich von größter Bedeutung, daß kein Wasser in das Saughütchen gelangt, denn wenn man den oberen Rand des Kolbens nach dem Entfernen des Saughütchens auch noch so sorgfältig abtrocknet, so geschieht es doch leicht, daß beim Entfernen des Pfropfens etwas unreine Flüssigkeit in den Kolben eingesaugt wird.

Es hat sich gezeigt, daß man das Gummisaughütchen am leichtesten aufsetzt, indem man es mit vier Fingern ausdehnt, in dasselbe hineinhaucht, worauf es leicht über den Kolbenhals gleitet.

C. Die Titration.

Das von *Olow* vorgeschlagene Verfahren zur Entfernung des Pfropfens hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen. Es soll jedoch erwähnt werden, daß der Innendruck mitunter derart erhöht werden kann, daß der Pfropfen aus dem Kolbenhals herausspringt und die Probe durch herunterfallendes eingetrocknetes Blut vernichtet wird. Es ist deshalb am sichersten, den Kolben mit der einen Hand zu halten und den Pfropfen mit der anderen zu stützen, wobei man auch fühlt, sobald der Pfropfen sich loslöst.

Widmark benutzte zum Zusetzen der 25 ccm destillierten Wassers Trichter und Meßglas. Bequemer ist es, das Wasser mittels eines Apparates zuzusetzen, der im großen ganzen mit dem von *Hagedorn* (4) beschriebenen übereinstimmt. Bei diesen Versuchen soll die Pipette 25 ccm fassen. Bei diesem Verfahren benötigt man kaum halb so viel Zeit als zum Ausführen der gleichen Operation mit Meßglas und Trichter.

Um die gleichartige Ausführung der Titration zu kontrollieren, ist es zweckmäßig, die titrierten Kolben in Ordnungsfolge aufzustellen. Hierbei soll man, wenn genau titriert wurde, durch Nachblauen eine Farbenskala erhalten, wobei der erste Kolben den stärksten und der letzte den schwächsten Ton aufweist. Sollte in irgend einem Kolben keine Nachbläuung auftreten, so zeigt dies an, daß die fragliche Probe übertitriert wurde.

II. Bestimmung der Konstanten.

Die Konstante, d. h. das Verhältnis zwischen Methylalkoholmenge und verbrauchtem Bichromat kann theoretisch nicht berechnet werden, da der Methylalkohol wahrscheinlich in keines seiner Oxydationsprodukte quantitativ übergeht. Zur Ermittlung der Konstanten habe ich eine Serie von Bestimmungen mit bekannten Methylalkoholmengen in wechselnden Konzentrationen ausgeführt.

Tabelle I. Das Verhältnis zwischen Alkoholmenge u. reduziertem Bichromat.

Gewicht der Probe mg	Berechnete Alkoholmenge γ	Reduziertes Bichromat n/200 . 100 ccm	$k = \frac{\text{Alkohol}}{\text{Bichromat}}$	Konzentration der Alkohollösung in Prom.
108	108	79	1,36	1,00
135	135	100	1,35	
117	117	83	1,40	
82	82	60	1,36	
81	81	60	1,35	
90	90	76	1,18	
105	105	68	1,54	
54	54	53	1,02	
122	122	84	1,34	
83	83	62	1,34	
71	71	57	1,26	
115	115	91	1,27	
110	110	77	1,30	
86	86	61	1,41	
108	108	80	1,34	
112	112	83	1,35	
99	99	72	1,37	
108	108	81	1,33	
128	128	98	1,31	
96	86	81	1,19	
110	110	79	1,39	
108	108	80	1,34	
112	112	82	1,37	
103	103	73	1,40	
106	106	81	1,31	
78	78	58	1,35	
92	92	65	1,42	
79	79	62	1,28	
96	96	81	1,19	
109	109	81	1,33	
66	66	50	1,36	
106	106	82	1,36	
101	101	72	1,41	
117	117	81	1,44	
58	58	39	1,48	
40	40	30	1,33	
86	86	68	1,26	
92	67	52	1,29	0,73
143	104	78	1,33	
111	81	60	1,35	
116	85	66	1,28	
97	71	52	1,37	
69	50	37	1,35	
87	64	46	1,34	
94	69	53	1,30	
103	75	55	1,36	
108	79	58	1,36	
88	64	48	1,33	
130	95	68	1,38	
94	67	51	1,31	
69	50	37	1,35	
114	83	65	1,27	
101	74	55	1,35	
77	56	43	1,32	
100	73	56	1,31	

Teils wurde aus Oxalsäureester hergestellter Methylalkohol und teils Alcohol methylicus puriss. von *E. Merck*, Darmstadt, verwendet. Sowohl mit dem einen wie mit dem anderen wurde die gleiche Konstante erhalten.

In Übereinstimmung mit *Widmark* wurde hier die Bezeichnungsweise benutzt, *daß mit einer Alkohollösung von der Konzentration 1 Prom. eine Lösung gemeint wird, die in 1 g 1 mg Alkohol enthält.*

Die bei diesen Versuchen verwendete Bichromat-Schwefelsäuremischung enthielt pro 100 ccm Schwefelsäure 0,050 g Bichromat. Bei Äthylalkoholbestimmungen kann diese Lösung bis zu 100 γ (1 γ = 0,001 mg) Äthylalkohol, bei Methylalkohol dagegen bis zu 200 verwendet werden.

Zur Titration wurde eine n/200 Thiosulfatlösung benutzt.

Tabelle I zeigt die bei der Bestimmung der Konstanten erhaltenen Werte.

Als Mittel dieser 55 Bestimmungen wurde 1,33 mit einem Mittelfehler für die einzelne Bestimmung von $\pm$ 0,077 und einem Mittelfehler des Mittels von $\pm$ 0,010 erhalten.

Wird also eine n/200 Thiosulfatlösung verwendet, so entspricht 0,01 ccm derselben 1,33 γ Methylalkohol.

Das Verhältnis zwischen Alkoholmenge und reduziertem Bichromat ist also für sämtliche untersuchten Mengen konstant. In Übereinstimmung mit dem, was *Widmark* bezüglich des Äthylalkohols anführt, kann man auch beim Methylalkohol keine Beziehung zwischen dem Gewicht der Blutprobe und der Größe der Konstante feststellen.

Wie sich aus der Tabelle I ergibt, wurden zwei verschiedene Lösungen von verschiedener Konzentration verwendet. Die erste Serie Bestimmungen wurde ungefähr vor einem halben Jahre, vor der Ausführung der im folgenden beschriebenen Tierversuche, die letztere nachher gemacht. Die Übereinstimmung der beiden Konstanten innerhalb der beiden Serien zeigt deutlich die Bedeutung der erworbenen Übung. Der größte und kleinste Wert in der ersten Serie ist 1,54 und 1,02, in der letzteren 1,38 und 1,27.

Es soll deshalb ausdrücklich hervorgehoben werden, daß diese Alkoholmethode — wie überhaupt Mikromethoden im allgemeinen — erst nach einiger Zeit Übung gute Resultate ergibt.

An zweckmäßigsten wird die Methode zuerst unter Verwendung bekannter reiner Alkohollösungen eingeübt, aus welchen die Konstante gleich wie oben berechnet wird. Hierdurch erhält man eine Garantie dafür, daß sich kein „persönlicher" Fehler eingeschlichen hat.

Die früher von *Olow* ausgeführten Bestimmungen der Konstanten für Äthylalkohol ergaben bei einer Titration mit n/200 Thiosulfat-

lösung einen Wert von 0,565. Die Konstante für Methylalkohol ist also fast doppelt so groß, was mit dem von *Nicloux* früher gefundenen Verhältnis gut übereinstimmt.

Einige elementare Versuche über den Konzentrationsfall des Methylalkohols im Blute.

Folgende Versuche bezwecken vor allem, die praktische Verwendbarkeit der Methode beim Verfolgen von Konzentrationsveränderungen des Methylalkohols im Blute zu demonstrieren. Sämtliche Werte sind Media von Doppelbestimmungen.

Die Versuche wurden mit einer bedeutend geringeren Alkoholmenge, als bisher zu solchen Versuchen verwendet, ausgeführt. Sie überstieg in keinem Falle 1 g pro Kilogramm Körpergewicht, und die Konzentration im Blute überstieg nie 1,3 Prom. Die Methylalkoholmenge ist vollkommen mit jener vergleichbar, die im Menschenblute nach dem Verzehren geringer Mengen Holzgeistes auftreten kann.

Die Kurven für den Konzentrationsfall des Methylalkohols im Blute stimmen im großen ganzen mit dem überein, was früher von *Nicloux* und *Placet* (5) bei bedeutend höheren Konzentrationen beobachtet wurde. Wir können auch hier den äußerst langsamen Abfall feststellen, wodurch der Methylalkohol erheblich länger im Organismus verbleibt als der Äthylalkohol. Die Bedingungen für eine Akkumulation des Methylalkohols werden hierdurch, wie *Nicloux* hervorhebt, in hohem Grade begünstigt. Noch 18 bis 20 Stunden nach der Injektion dieser geringen Menge Methylalkohols kann dieser im Blute deutlich nachgewiesen werden.

Der Konzentrationsfall verläuft indessen nicht ganz kontinuierlich. In fast allen Fällen, in denen die Alkoholkurve im Blute bestimmt wurde, konnte eine kurzfristige Erhöhung der Kurve beobachtet werden. Diese findet 4 bis 6 Stunden nach der Injektion statt, mitunter einige Stunden später. Auch die von *Nicloux* publizierten Kurven zeigen eine derartige temporäre Erhöhung der Kurve. In gewissen Fällen konnte auch eine Erhöhung nach der Injektion von Äthylalkohol beobachtet werden. Hier tritt diese indessen erst dann ein, wenn der Alkoholgehalt relativ niedrige Werte erreicht hat. Über die Verhältnisse beim Äthylalkohol wird *Olow* näher berichten.

Gegenwärtig können wir für die Entstehung dieser regelmäßigen Erhöhung der Konzentrationskurve keine Erklärung geben. Es ist wahrscheinlich, daß diese Erhöhung der titrierten Werte nicht durch eine Erhöhung des Methylalkoholgehaltes im Blute verursacht wird. Möglicherweise könnte diese dadurch entstehen, daß eine vom Alkohol veranlaßte Auslösung gewisser flüchtiger organischer Verbindungen stattfindet, die von der Bichromat-Schwefelsäuremischung aufgenommen werden.

Tabelle II.

Versuch 1. Kaninchen, Gewicht 2560 g, 2,1 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins linke Ohr injiziert. 6 Uhr 30 Minuten nachmittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
7p	60	0,75	11p	300	0,74
8	120	0,70	11 30	330	0,72
9	180	0,63	12	360	0,64
10	240	0,72	2a	480	0,47
10 30	270	0,71	8	840	0,20

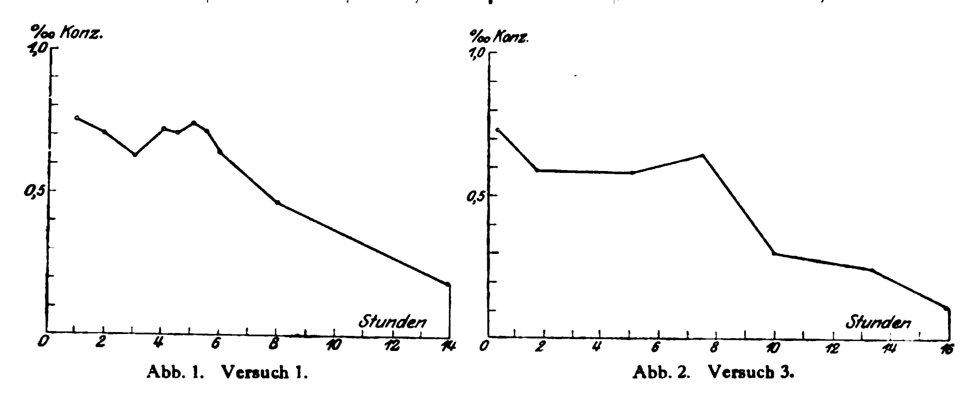


Abb. 1. Versuch 1. Abb. 2. Versuch 3.

Tabelle III.

Versuch 2. Kaninchen, Gewicht 2280 g, 2,0 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins linke Ohr injiziert. 12 Uhr 10 Minuten vormittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
1a	50	0,70	6a	350	0,67
2	110	0,64	7	410	0,52
3	170	0,64	8	470	0,45
4	230	0,68	9	530	0,42
5	290	0,73			

Tabelle IV.

Versuch 3, Kaninchen, Gewicht 2690 g, 2,2 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins rechte Ohr injiziert. 10 Uhr 15 Minuten vormittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
12p15	120	0,73	10p15	720	0,30
2 5	230	0,61	1a10	895	0,14
5 10	415	0,59	3 45	1065	0,02
7 30	555	0,66			

Tabelle V.

Versuch 4. Kaninchen, Gewicht 2670 g, 2,3 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins linke Ohr injiziert. 11 Uhr 50 Minuten vormittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
1p	70	0,86	5p55	365	0,66
1 50	120	0,79	7	430	0,60
2 50	180	0,69	9 55	505	0,48
4 50	300	0,84	12a40	660	0,16

Tabelle VI.

Versuch 5. Kaninchen, Gewicht 2340 g, 2,1 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins rechte Ohr injiziert. 6 Uhr 30 Minuten nachmittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
6p45	15	0,98	11p	270	0,74
7 30	60	0,75	11 30	300	0,72
8 30	120	0,68	1a30	420	0,51
9 30	180	0,63	4 30	600	0,31
10 30	240	0,70	7 30	780	0,20

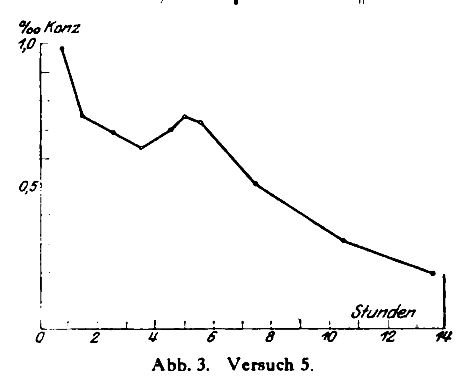


Abb. 3. Versuch 5.

Tabelle VII.

Versuch 6. Kaninchen, Gewicht 2100 g, 2 g Methylalkohol in 10 ccm Lösung intravenös ins rechte Ohr injiziert. 2 Uhr 45 Minuten nachmittags.

Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.	Zeit	Minuten nach Injektion	Konzentration in Prom.
3p	15	1,11	9p45	420	1,07
4	75	1,24	12	555	0,77
5 15	150	1,15	3a40	745	0,96
6 30	225	1,25	9 20	1115	0,44
7 50	305	1,13			

Zusammenfassung.

1. Die von *Widmark* ausgearbeitete Mikromethode wurde zur Bestimmung von Methylalkohol verwendet. Die Methode verlangt etwa 100 mg Blut. Eine eingenommene Methylalkoholmenge von weniger als 1 g pro Kilogramm Körpergewicht kann quantitativ bestimmt und die Konzentrationsveränderungen im Blute durch Serienbestimmungen leicht verfolgt werden.

2. Als Beispiel für die Anwendbarkeit der Methode werden einige Konzentrationskurven von Kaninchen mitgeteilt, welche etwa 0,8 g Methylalkohol pro Kilogramm Körpergewicht erhalten hatten. Es wird die langsame Ausscheidung dieser geringen Methylalkoholmenge konstatiert. Eine temporäre Erhöhung der Konzentrationskurve tritt in der Regel 4 bis 6 Stunden nach der Injektion ein.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **181**, 473. — 2) C. r. de la Soc. de Biol. **70**:**2**, 59, 1912. — 3) Diese Zeitschr. **184**, 407. — 4) Undersögelser vedrörende Blodsukkerregulationen hos Mennesket. Köbenhavn 1921, S. 157, Abb. 4. — 5) Journ. de Physiol. et Pathol. générale **14**, 916, 1912.

Über die Senkung der roten Blutkörperchen in verschieden hoher Blutsäule.

Von

L. Berczeller und **H. Wastl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 13. Februar 1924.)

In den vorangehenden Mitteilungen wurden einzelne die Methodik der Blutkörperchensenkungsprobe beeinflussende Faktoren einer näheren Untersuchung unterworfen[1]). Es konnte gezeigt werden, daß sich die verschiedenen Tierblutarten gegenüber verschiedenen Eingriffen nicht gleichmäßig verhalten und daß in manchen Fällen die hier beobachteten Unterschiede auch die Resultate der klinischen Untersuchungen beeinflussen können[2]).

Bei unseren Untersuchungen haben wir auch beobachtet (wie dies schon öfters von anderen Autoren erwähnt wurde), daß die *Länge der Blutsäule* von Einfluß auf den Senkungsvorgang sein kann. Auf die Wichtigkeit dieser Tatsache in den klinisch-diagnostischen Untersuchungen hat *Horvath*[3]) hingewiesen.

Wir konnten beobachten, daß bei den verschiedenen Tierblutarten die Veränderung des Senkungsvorganges mit der Länge der Blutsäule nicht immer nachzuweisen ist, ja sogar, daß bei ein und derselben Blutart die Zunahme des Senkungsvermögens in längeren Blutsäulen durch Veränderung des Blutes vollkommen aufgehoben werden kann.

Zunächst sollen nur in *vertikalen Röhren* ausgeführte Versuche erwähnt werden. (Methodik wie in den vorangehenden Mitteilungen.) Die Senkungswege der roten Blutkörperchen nehmen mit steigender Länge der Blutsäule sehr beträchtlich beim *Pferdeblut* zu.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß sich diese Unterschiede in den Senkungswegen erst nach einer gewissen Zeit ausbilden und ihr Maximum erreichen, so daß z. B. in den ersten 15 Minuten bei Verdoppelung, ja sogar Vervierfachung der Röhrenlänge noch keine Veränderung der Senkung nachzuweisen ist. Nach 30 Minuten aber sind die zurückgelegten Wege den Bluthöhen ungefähr proportional, und im weiteren

---

[1]) *Berczeller* und *Wastl*, diese Zeitschr. **140**, 368—373, 1923; **142**, 524—536; **143**, 236—247; **143**, 333—341; **144**, 159—169, 1924; **145**, 82—95. Klin. Wochenschr. 1924, 3. Jahrg., Nr. 5.

[2]) *Dieselben*, Münch. med. Wochenschr. 1924 Nr. 8, S. 228—229.

[3]) Ebendaselbst 1923.

Tabelle I. Pferdeblut (Wallach): Citratplasma (etwa 5 Std. nach Entnahme).

Zeit in Min.	Senkung bei 90° (freie Plasmahöhen in mm)			
	65 mm*)	130 mm*)	260 mm*)	520 mm*)
15	3,0	2,0	3,0	16,0
30	5,0	10,5	15,0	60,0
45	6,5	29,0	52,0	112,0
60	8,0	42,0	85,0	164,0
120	16,0	55,5	125,0	261,0
195	20,5	60,0	133,0	283,0
270	24,0	62,5	137,0	295,0
1170	33,0	69,0	146,0	312,0

*) Länge der Blutsäule. Weite des Röhrchens 2 mm.

Verlauf nehmen die Wegstrecken sogar noch stärker zu als es der Blutsäulenlänge entsprechen würde. So wird z. B. die Senkung im doppelt so langen Rohre bis um das etwa Fünffache größer als im kürzesten Rohre, und in der achtfach längeren Blutsäule werden in einem Falle die zurückgelegten Wegstrecken sogar 20 mal länger. Diese großen Unterschiede in den zurückgelegten Wegen (freie Plasmahöhen) bleiben nicht konstant, sondern sie werden teilweise ausgeglichen, bevor die Senkung zum Stillstand kommt.

Beim *Hundeblut* sehen wir schon eine wesentliche Veränderung des Senkungsvorganges in verschieden langen Röhren, wenn wir es mit Pferdeblut, von dem ein Beispiel vorhin angegeben wurde, vergleichen.

Tabelle II. Hundeblut (♂): Citratplasma (2 Stunden nach Entnahme).

Zeit in Min.	Senkung bei 90°					
	10*)	20*)	40*)	80*)	160*)	320*)
15	1,5	1,25	0,5	1,5	1,0	0,25
30	2,5	2,0	2,25	2,5	2,25	1,25
45	4,0	3,5	3,75	3,5	4,0	4,0
60	4,0	4,0	5,0	6,0	6,0	6,0
80	5,0	5,0	7,0	9,0	10,0	10,5
110	5,0	6,0	9,5	14,0	17,0	21,0
900	5,0	10,0	19,0	32,0	60,0	100,0

*) mm der Blutsäule. Röhrchenweite 2 mm.

In der ersten Stunde der Senkung ist keine wesentliche Veränderung sogar in der achtfach längeren Blutsäule zu beobachten, und erst später tritt allmählich die Zunahme des Senkungsweges auf, ohne diese großen Differenzen aufzuweisen, welche beim Pferdeblut zu beobachten waren.

Kaninchenblut (Citrat- und Oxalatplasma) verhält sich ganz ähnlich wie Hundeblut. Die Differenzen in den verschieden langen Röhren werden noch geringer.

Beim *Schweineblute* (Citrat- und Oxalatplasma) konnten wir überhaupt keine Unterschiede in der Senkung beobachten, selbst wenn eine 32fach längere Blutsäule verwandt wurde.

Tabelle III. Schweineblut (♀): Citratblut (2 Stunden nach Entnahme).

Zeit in Min.	Senkung bei 90°					
	10*)	20*)	40*)	80*)	160*)	320*)
40	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2
60	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,2
80	0,5	0,5	0,5	0,75	0,25	0,5
100	0,75	1,0	1,0	1,25	0,5	0,5
120	1,0	1,25	1,25	1,25	0,75	0,75
180	1,25	2,0	2,0	1,75	1,0	1,5
250	2,0	3,0	2,5	2,0	1,75	2,0
3500	2,0	3,0	2,75	2,25	2,0	2,0
1200	3,0	5,0	5,5	4,0	3,0	3,5
1500	4,0	6,0	6,0	5,0	4,0	4,5

*) mm der Blutsäule. Röhrchenweite 2 mm.

Allerdings ist auch die Senkung im Schweineblut eine viel langsamere als im Pferdeblut, und erst nach 20 bis 25 Stunden erreicht es in diesem Falle dieselben Senkungshöhen, wie beim Pferdeblut in etwa 10 bis 15 Minuten.

Dasselbe Verhalten wie beim Schweineblut ist die Regel bei den *defibrinierten Blutproben.* So konnten wir keine Veränderung der Senkungshöhen in verschieden langen Blutsäulen beobachten bei: *Rinderblut, Schweineblut, Hammelblut, Hundeblut,* und nur eine ganz minimale bei Kaninchenblut. *Pferdeblut* bildet eine Ausnahme, denn auch im defibrinierten Blute ist die Senkung in höherer Blutsäule eine größere, wenn auch nicht so ausgesprochen, wie in den verschiedenen Pferdeplasmen, sofern diese bald nach der Entnahme untersucht werden. 24 bis 48 Stunden lang gestandenes Oxalatblut dagegen entspricht in seinem Senkungstypus mehr dem defibrinierten Blute (wie wir dies bereits an anderer Stelle erwähnt haben). Dies ergibt sich auch deutlich aus entsprechenden Versuchen bei verschiedener Röhrenlänge.

Tabelle IV. Pferdeblut (Wallach).

Zeit in Min.	Oxalatblut (48h nach Entnahme)						Zeit in Min.	Defibriniertes Blut (etwa 7h nach Entnahme)					
	10	20*)	40	80*)	160	320*)		10*)	20*)	40*)	80*)	160*)	320*)
5	—	1,0	—	1,0	—	1,0	5	1,0	1,25	1,0	1,25	1,0	1,0
10	—	2,0	—	2,0	—	2,0	10	1,5	1,5	1,5	2,5	1,5	1,5
15	—	2,5	—	2,5	—	2,5	20	3,25	3,5	3,5	5,0	2,5	5,5
20	—	3,25	—	3,25	—	3,0	40	4,5	5,0	7,0	13,0	9,0	25,0
30	—	4,5	—	4,5	—	4,0	60	5,0	6,0	10,0	18,0	20,0	88,0
40	—	5,5	—	6,0	—	5,0	100	5,0	7,0	12,5	25,0	49,0	114,0
60	—	6,5	—	16,0	—	6,5	940	5,5	10,5	19,0	38,0	78,0	159,0
80	—	7,0	—	27,0	—	24,0							
100	—	8,0	—	30,0	—	43,0							
400	—	10,5	—	38,0	—	158,0							
1500	—	10,5	—	40,0	—	175,0							

*) Länge der Blutsäule in mm. Weite der Röhrchen 2 mm.

Werden dagegen Pferdeblutkörperchen in Ringer gewaschen, so geht mit der weiteren Abnahme des Senkungsvermögens auch der Unterschied in der Senkung in verschieden langen Röhren verloren.

Tabelle V. Pferdeblut (♀, dreimal mit Ringer gewaschen, in Ringer in 40proz. Suspension aufgeschwemmt).

Zeit in Min.	Senkung bei 90°			
	65*)	130*)	260*)	520*)
40	0,25	0	0,20	0
70	0,25	0	0,25	0,20
100	0,50	0,20	0,30	0,25
130	0,75	0,25	0,50	0,50
160	1,00	0,50	0,50	0,75
220	1,25	0,50	1,00	1,25
300	1,50	1,0	1,00	1,50

*) mm der Blutsäule. Röhrchenweite 2 mm.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Veränderung des Senkungsvorganges in verschieden langen Röhren durch die durch die *Agglutination* verursachte schnellere Senkung bedingt wird. Es läßt sich daher diese Untersuchungsmethode (Senkung bei 90°) dazu verwenden, um die Agglutination nachzuweisen und quantitativ zu verfolgen.

Die Aufgabe der weiteren Untersuchungen war, zu entscheiden, ob die Zunahme der Senkungshöhen in längeren Blutsäulen *allein* durch die Agglutination oder durch sonstige Einflüsse auf die Geschwindigkeit verursacht wird. Zu diesem Zwecke wurden die Versuche auch in den *schiefen* Röhren aufgestellt. Diese Versuche, welche parallel mit jedem der erwähnten Versuche (welche auch nur einzelne Versuchsbeispiele darstellen) aufgestellt wurden, ergaben, daß in den schiefen Röhren in den längeren Röhren die Senkung *regelmäßig* schneller stattfindet.

Als Versuchsbeispiel ist in Tabelle VI ein defibriniertes Rinderblut angeführt. Die Senkung wird in den kürzeren Röhren durch die Schiefstellung viel weniger verändert als in den längeren Blutsäulen. Dasselbe Verhalten zeigen auch die gewaschenen Blutkörperchen.

Ohne auf den genaueren Vergleich der verschiedenen Blutproben hier näher einzugehen, muß nur betont werden, daß die Schiefstellung nicht nur bei jenen Blutproben, bei denen die Senkung bei 90° in verschieden hoher Blutsäule gleich stattfindet, in dieser Weise wirkt, sondern auch bei denjenigen Blutproben, bei denen die Senkung bei 90° in längeren Blutsäulen zunimmt.

In Tabelle VII ist als ein derartiges Versuchsbeispiel ein Pferdeblut angeführt; durch Schiefstellung wird insbesondere im Versuchsbeginn der Unterschied zwischen kürzerem und längerem Rohre größer.

Tabelle VI. Defibriniertes Rinderblut.

Zeit in Min.	90°						67,5°						45°						22,5°					
	10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320
100	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0,5	0,5	1,0	1,5	0,5	0,5	1,25	1,5	4,0	4,5	0,75	0,75	2,0	2,5	5,0	6,0
250	0	0	0	0	0	0	0,75	1,0	1,5	3,0	4,5	6,0	1,0	2,0	3,5	6,0	11,0	15,0	2,0	3,25	5,0	8,0	14,0	22,0
370	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,0	1,25	2,0	4,5	7,0	12,0	1,5	2,5	4,5	8,0	16,0	25,0	3,0	4,0	7,0	11,0	22,0	33,0
470	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,5	2,25	2,5	5,0	8,0	15,0	2,5	3,0	5,5	9,0	20,0	30,0	3,25	4,5	8,0	13,5	27,0	46,0
670	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	2,5	4,0	7,7	11,0	22,0	3,0	4,0	7,0	14,0	25,0	41,0	3,5	6,0	11,0	18,0	36,0	61,0
1390	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,0	4,0	7,0	13,5	23,0	42,0	4,0	6,5	12,0	20,0	40,0	71,0	4,5	8,5	15,0	27,0	55,0	88,0
1930	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	5,0	9,0	17,0	30,0	55,0	4,5	7,0	13,0	24,0	46,5	86,0	5,0	9,0	17,0	31,0	62,0	112,0
4200	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	4,0	6,5	13,0	26,0	49,0	87,0	5,0	9,0	18,0	33,0	60,0	120,0	5,5	10,0	20,0	38,0	78,0	136,0

Tabelle VII. Pferdeblut (Wallach): Citratplasma.

Zeit in Min.	90°				67,5°				45°				22,5°			
	65	130	260	520	65	130	260	520	65	130	260	520	65	130	260	520
15	3,0	2,0	3,0	16,0	14,5	22,0	42,5	127,0	16,0	31,0	96,5	215,0	21,0	37,0	100,0	260,0*)
30	5,0	10,5	15,0	60,0	21,0	38,0	90,0	203,0	23,0	47,0	119,0	240,0	27,0	52,0	120,0	297,0*)
45	6,5	29,0	52,0	112,0	24,5	46,0	105,0	233,0	27,0	52,5	129,0	255,0	30,0	56,5	130,0	265,0*)
60	8,0	42,0	85,0	164,0	27,0	50,0	112,0	248,0	29,5	56,0	133,0	262,0	32,0	59,0	135,0	259,0
120	16,0	55,5	125,0	261,0	31,0	58,5	125,0	265,0	33,0	63,0	141,0	272,0	34,0	65,0	144,0	260,0
195	20,5	60,0	133,0	283,0	33,0	62,0	131,0	272,0	35,0	65,0	145,0	278,0	36,0	67,0	150,0	268,0
270	24,0	62,5	137,0	295,0	35,0	64,0	135,0	277,0	36,0	67,0	147,0	280,0	37,0	68,0	155,0	270,0
1170	33,0	69,0	146,0	312,0	37,0	70,0	143,0	290,0	38,0	71,0	152,0	290,0	37,0	71,0	160,0	290,0

*) Belag von roten Blutkörperchen an der Hinterwand des Röhrchens.

Der wesentliche Unterschied bei 90°, welcher eben durch die Agglutination verursacht wird und das Aufhören dieses Unterschiedes in den schiefgestellten Röhren weisen darauf hin, daß diese Erscheinung durch das verschiedene Aneinander-Vorbeiströmen von Blutkörperchen und Plasma verursacht wird. Wir haben schon wiederholt darauf hingewiesen, daß die Senkung der roten Blutkörperchen nicht als die Bewegung *eines* roten Blutkörperchens *allein* oder von Konglomeraten von Blutkörperchen betrachtet werden kann, sondern sie muß als das *Strömen der roten Blutkörperchen* bzw. Konglomerate (plus einer geringen Plasmamenge) und der entgegengesetzten Strömung des reinen Plasmas aufgefaßt werden. Beim Schiefstellen der Röhrchen strömen die roten Blutkörperchen mehr oder in größerer Dichte an der unteren Wand, während an der Oberseite das in entgegengesetzter Richtung fließende Plasma weniger Hindernisse findet. Daher kommt es zu den großen Unterschieden in der Trennung zwischen Plasma bzw. Serum und roten Blutkörperchen bei der Schiefstellung einerseits, bei der Vertikalstellung andererseits. Bei vertikaler Stellung der Blutsäule wird diese gegeneinander laufende Strömung der beiden Phasen des Blutes begünstigt, je mehr die roten Blutkörperchen agglutinieren und je schneller sie sinken, da (neben spezifischen Unterschieden zwischen den einzelnen Blutarten) die Konglomerate eine kleinere Oberfläche besitzen und dem Aufwärtsströmen des Plasmas einen geringeren Widerstand entgegensetzen.

Je länger die Blutsäule ist, desto später kommt das Strömen zum Stillstand und desto größer sind die Unterschiede zwischen den freien Plasmahöhen in kurzen und langen Röhren. Bei Schiefstellung sind die Unterschiede in verschieden langen Röhren bei allen Blutarten nachzuweisen, dagegen bei vertikaler Stellung nur bei den agglutinierenden, die schnell sinken.

In diesem Zusammenhange soll auch erwähnt werden, daß bereits *Helmholtz* auf die Bedeutung des Strömens der roten Blutkörperchen hingewiesen hat. Die physikalische Analyse dieser Erscheinungen ist auch heute noch ebenso in den Anfangsstadien wie seinerzeit, vom physiologischen Gesichtspunkte aus kann das Problem aber weiter geklärt werden, wenn wir die großen Unterschiede zwischen physiologischen und pathologischen Verhältnissen in dieser Hinsicht vergleichen.

Über die Oberflächenspannung von Saponinlösungen.

Von

H. Wastl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 13. Februar 1924.)

Die Oberflächenspannung von Saponinlösungen[1]) wurde außer in rein physikalisch-chemischen Arbeiten auch im Vergleich mit den biologischen Wirkungen der Saponine mehrfach untersucht, da einerseits die große Schaumfähigkeit der Saponine, andererseits ihre so verschiedene hämolytische bzw. Giftwirkung von Interesse waren.

Die Schaumfähigkeit von Seifen- und Saponinlösungen verändert sich nicht parallel mit ihrer Oberflächenspannung[2]), und auch zwischen Oberflächenspannung und biologischer Wirkung von Saponinen konnte keine Parallelität nachgewiesen werden[1])[3]). Immerhin kommen in den beiden Arbeiten doch gewisse Beziehungen zwischen diesen beiden Größen zur Beobachtung.

Allerdings sind die Saponine keine geeigneten Substanzen, um den Zusammenhang zwischen physikalischen Eigenschaften und biologischen Wirkungen zu prüfen, da man nicht einmal die hämolytische mit den anderen biologischen Wirkungen restlos in Parallele setzen kann. Dies kann teils auf die kolloidchemische Labilität der Saponinlösungen, teils aber auf chemische Veränderungen der Saponine im Tierkörper zurückgeführt werden [vgl. auch *Sieburg* und *Bachmann*[4]), *Kawashima Renzaburo*[5])]. Es muß aber auch darauf hingewiesen werden, daß die

---

[1]) Eine Zusammenstellung der diesbezüglichen Literatur gibt *L. Kofler*, diese Zeitschr. **129**, 64, 1922.

[2]) *L. Berczeller*, ebendaselbst **66**, 222, 1914.

[3]) *H. E. Woodward* und *C. L. Alsberg*, Journ. of Pharm. a. exper. Ther. **16**, 237, 1920.

[4]) Diese Zeitschr. **126**, 130, 1921.

[5]) Act. schol. med. Univers. imp. Kioto **4**, 2. H, 1921.

Bestimmung von Grenzkonzentrationen für die Wirksamkeit einer Substanz keinesfalls ein Maß für ihre Wirkungsstärke ergibt.

Die große Schaumfähigkeit der Saponine ist sicherlich schuld daran, daß die Oberflächenspannung wässeriger Lösungen, welche gegen Verunreinigungen so empfindlich ist, große Variationen je nach der Herstellungsweise der einzelnen Saponinpräparate aufweist. Trotzdem lassen sich bei reinen Saponinpräparaten von derselben „Substanz" (*Merck*sche Saponinpräparate) sehr gleichmäßige Oberflächenspannungswerte erhalten[1]).

Jedenfalls ist die Messung der Oberflächenspannung von Saponinlösungen (Stalagmometrische Methode von *Traube*) geeignet, um Unterschiede zwischen verschiedenen Präparaten derselben „Substanz" wie auch Ähnlichkeiten oder Verschiedenheiten von verschiedenartigen Saponinen aufzudecken, wobei ich teils die Oberflächenspannungskonzentrationskurven, teils die Wirkung von Säuren und Laugen auf diese Lösungen bestimmt habe.

Berczeller (l. c.) konnte nachweisen, daß das *Merck*sche Saponin in saurer Lösung die Oberflächenspannung des Wassers mehr erniedrigt als in neutraler. Ich konnte diese Angaben betreffs des *Merck*schen Saponins bestätigen; Alkalizusatz erhöht die Oberflächenspannung der Lösungen dagegen in geringem Grade.

Nun ließ sich zeigen, daß sich nicht alle Saponine gegen geringen Säure- bzw. Alkalizusatz gleich verhalten; besonders bei Primulasaponin wird durch Säurezusatz die Oberflächenspannung der Lösungen stark erhöht, durch Alkalizusatz leicht erniedrigt; in ähnlicher Weise findet sich diese Erscheinung bei einer Reihe anderer Saponine, wenn auch in geringerem Grade. Nur bei Digitonin und Sapindussaponin ist die Säure-Alkaliwirkung eine ähnliche wie beim *Merck*schen Saponin. Kastaniensaponin wurde durch Säurezusatz nahezu nicht beeinflußt.

Daraus ergibt sich, daß man nicht einfach die Oberflächenspannungen der neutralen Lösungen verschiedener Saponine vergleichen

---

[1]) Die Tropfenzahl (Zimmertemperatur) war z. B. in dem benutzten Stalagmometer für Aqua dest. 43,50, für zwei 1proz. Lösungen von *Merck*schem Saponin 48,35 bzw. 48,45. *Berczeller* (diese Zeitschr. **66**, 218ff., 1914) hat ebenfalls für ein anderes Präparat des *Merck*schen Saponins eine Tropfenzahl von 48,20 gemessen (Wasserwert 43,80). Zwischen den beiden Untersuchungen liegen 9 Jahre. Auch der von *Kofler* (l. c.) bestimmte Wert eines anderen reinen *Merck*schen Saponins stimmt damit gut überein. Andererseits ergeben sich aus den verschiedenen Daten der Literatur (z. B. *Woodward* und *Alsberg* bei Quillajasaponin) wesentliche Unterschiede in der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen von Saponinpräparaten, die nach verschiedenen Methoden aus demselben Ausgangsmaterial hergestellt wurden.

kann, wenn man die Wirksamkeiten vergleichen will, denn je nach der H^+-Konzentration wird die Reihe der Saponine (geordnet nach ihrer Beeinflussung der Oberflächenspannung) geändert. Die Reihenfolge ist in neutraler Lösung die in Tabelle I angegebene (nach *Kofler* ist die Reihenfolge in 1proz. Lösung dieselbe). Wenn dagegen 0,2 ccm n/5 HCl zu 10 ccm 1proz. Saponinlösung zugesetzt wurden, war die Reihenfolge nach steigender Oberflächenspannung die folgende: Digitonin, Sapindussaponin, Kastaniensaponin, Rumansaponin, Mercksaponin II, Saponin puriss. album., Mercksaponin I, Primulasaponin.

Tabelle I.

Wirkung von Säure und Lauge auf Saponinlösungen. (Tropfenzahl im *Traube*schen Stalagmometer.)

10 ccm 1 proz. Saponinlösung	Neutral	+ n/5 HCl					Neutral	+ n/5 NaOH		
		+ 0,1 ccm	+ 0,2 ccm	+ 0,3 ccm	+ 0,4 ccm	+ 0,5 ccm		+ 0,1 ccm	+ 0,3 ccm	+ 0,5 ccm
Digitonin	61,90	63,45	63,90	64,25	64,40	64,40	61,95	61,75	61,75	61,75
Kastaniensaponin .	55,90	55,55	55,50	55,40	55,20	55,00	—	—	—	—
Rumansaponin . .	55,60	55,50	54,30	54,20	54,00	54,10	55,60	57,25	57,30	57,25
Sapindussaponin .	55,15	55,50	57,70	57,60	57,65	57,65	55,15	51,75	50,75	50,15
Primulasaponin . .	50,15	48,65	47,90	47,50	47,50	47,60	49,95	50,55	50,50	50,80
Saponin pur. alb. .	49,20	51,10	51,75	52,10	51,80	52,20	49,10	49,15	49,40	49,55
II. Saponin *Merck* .	48,45	51,30	52,00	52,15	52,65	52,30	48,45	48,10	48,20	48,20
I. " "	48,35	50,05	50,83	51,60	51,70	51,60	48,80	48,40	49,15	49,10

Durch Veränderung der H^+-Konzentration um n/250 ist also die Reihenfolge wesentlich verschoben worden.

Es soll aus diesen Versuchen keinesfalls die Folgerung gezogen werden, daß die eigentliche Saponin„substanz" oder Verunreinigungen diese Erscheinung betreffend die Oberflächenspannung der Lösungen verursacht. Es läßt sich nur sagen, daß man die Saponine nicht in eine Reihe nach Oberflächenspannungen ordnen kann, um ein Vergleichsmaß für ihre biologischen Wirkungen zu finden, wie dies bei anderen Substanzen bereits wiederholt geschehen ist.

Bei Versuchen, die mit Mischungen von Saponinlösungen angestellt wurden, ergab sich z. B. folgende Beobachtung. Wenn man Lösungen von Primulasaponin mit anderen Saponinlösungen mischt, deren Oberflächenspannung durch Säure erniedrigt wird, so kommt auch bei Mischungen von gleichen Teilen dieser Saponinlösungen mit dem Primulasaponin die bei diesem nach Säurezusatz auftretende Erhöhung der Oberflächenspannung zur Beobachtung.

Tabelle II.

	Neutral	+ 0,6 n/5 HCl
Primulasaponin, 10 ccm 1 proz. Lösung	50,15	47,40
Saponin pur. alb., 10 ccm 1 proz. Lösung . . .	49,30	52,30
5 ccm Primulasaponin + 5 ccm Saponin pur. alb.	49,85	48,45
II. Saponin *Merck*, 10 ccm 1 proz. Lösung . .	48,45	52,40
5 ccm Primulasaponin + 5 ccm II. Saponin *Merck*	49,30	48,00

Daraus folgt, daß man auch aus der Oberflächenspannung von reinen Saponinlösungen nicht auf das Geschehen in Oberflächen selbst schließen kann, in denen noch andere Substanzen vorhanden sind.

Wenn es also auch nicht zu erwarten ist, daß die Oberflächenspannung von Saponinlösungen als Maß ihrer physiologischen Wirkung gelten kann, so wird ihre Messung doch für die nähere Charakterisierung der einzelnen Saponine sowie zur Prüfung ihrer Reinheit (Konstanz der Präparate) dienen können.

Über die Oxydation von Fructose in Phosphatlösungen.

Von

Otto Warburg und **Muneo Yabusoe.**

(Eingegangen am 16. Februar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Fructose, in neutralem Phosphat gelöst, autoxydabel ist. Bei der Oxydation bildet sich Kohlensäure, und zwar etwa $\frac{1}{3}$ Mol pro Mol absorbierten Sauerstoffs.

Glucose wird unter sonst gleichen Bedingungen von molekularem Sauerstoff nicht angegriffen, *Fructose* nach unseren bisherigen Erfahrungen *nur* in Phosphatlösungen, nicht aber in Lösungen anderer Salze. Es handelt sich also um eine spezifische Reaktion zwischen Phosphat, Fructose und molekularem Sauerstoff[1]).

I. Methoden.

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit bringen wir 5 bis 10 ccm Fructoselösung in einen 30 ccm fassenden Atmungstrog (Form diese Zeitschr. **142**, 70, 1923), in den Einsatz des Atmungstroges 1 ccm 5proz. Kalilauge zur Absorption der gebildeten Kohlensäure. Den Trog verbinden wir mit einem Barcroftmanometer, füllen Sauerstoff ein und schütteln im Thermostaten bei 38°. Innerhalb einer Stunde zeigt dann das Manometer Druckänderungen, die von der Zusammensetzung und Menge der eingefüllten Fructoselösung abhängen und bis zu 200 mm Wasser betragen. Die Ausschläge sind also

---

[1]) Wasserstoffsuperoxyd oxydiert Glucose, wie viele andere organische Substanzen, bei neutraler Reaktion, ein Vorgang, der nach *W. Loeb* durch Phosphat begünstigt wird. Hier beruht die Wirkung der Phosphate, wie *Harden* und *Henley* gezeigt haben, auf nichts anderem als einer Pufferwirkung, Phosphat kann durch beliebige andere Puffer ersetzt werden. Vgl. *W. Loeb*, diese Zeitschr. **29**, 317, 1910; **32**, 43 und 52, 1911; **46**, 288, 1912 und *Harden* und *Henley*, The Biochem. Journ. **16**, 143, 1922.

sehr groß und die Oxydationsgeschwindigkeiten genau meßbar. Eine Druckänderung von 1 mm bedeutet einen Sauerstoffverbrauch von etwa 2 cmm.

Soll neben dem Sauerstoffverbrauch auch die Kohlensäurebildung bestimmt werden, so beschicken wir drei Atmungströge — I, II und III — mit je 2 ccm Fructoselösung derselben Zusammensetzung. In den Einsatz des Troges I füllen wir Kalilauge. Trog I dient zur Messung des Sauerstoffverbrauchs. In die Einsätze der Tröge II und III füllen wir dreifach normale Schwefelsäure, die Tröge II und III dienen zur Bestimmung der Kohlensäure. — Die drei Tröge werden gleichzeitig in den Thermostaten eingehängt und zunächst 10 Minuten zwecks Temperaturausgleich geschüttelt. Dann wird die Schwefelsäure des Troges III aus dem Einsatz in die Fructoselösung eingekippt, der entstehende positive Druck ergibt den Kohlensäuregehalt der Fructoselösung zu Beginn des Versuchs („präformierte Kohlensäure"). Die beiden anderen Tröge werden einige Stunden geschüttelt. Sind die Ausschläge an den Manometern hinreichend groß geworden, so liest man sie ab und kippt nun die Schwefelsäure des Troges II aus dem Einsatz in die Fructoselösung. Hierbei entsteht ein positiver Druck, der den Kohlensäuregehalt der Fructoselösung am Ende des Versuchs ergibt. Die während der Oxydationsmessung *an den Gasraum* des Troges II *abgegebene* Kohlensäure endlich erhält man aus der Differenz der Manometerablesungen für Trog I und II, so daß alle Daten zur Verfügung stehen, um die gebildete Kohlensäure zu berechnen. Näheres in bezug auf die Berechnung findet man in Abschnitt VI dieser Arbeit. Die Genauigkeit einer Kohlensäuremessung beträgt etwa 2 Proz. vom Werte.

Das Fructosepräparat, das wir benutzten, war „Lävulose I" von *Kahlbaum*, die wir zunächst aus Alkohol umkristallisierten. 0,1624 g gaben bei der Elementaranalyse 0,2397 g Kohlensäure und 0,0995 g Wasser, das sind 40,27 Proz. Kohlenstoff und 6,86 Proz. Wasserstoff (berechnet 40,0 Proz. Kohlenstoff und 6,7 Proz. Wasserstoff). Da sich zeigte, daß die Umkristallisation an den Eigenschaften, die wir untersuchten, nichts änderte, arbeiteten wir später mit dem nicht gereinigten *Kahlbaum*schen Präparat.

II. Zeitlicher Verlauf der Oxydation.

Um den zeitlichen Verlauf der Oxydation zu untersuchen, lösen wir 2 g Fructose in 90 ccm sekundärem und 10 ccm primärem m/1 Phosphat (p_H etwa 7,7), leiten durch die Lösung bei 38° Sauerstoff und entnehmen zu verschiedenen Zeiten je 10 ccm Lösung, deren Oxydationsgeschwindigkeit wir auf die oben geschilderte Weise bestimmen. Das Ergebnis eines derartigen Versuchs ist in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I. 38°. Gasraum Sauerstoff.

Zeit nach Herstellung der Fructoselösung	In einer Stunde von 10 ccm Lösung verbrauchter Sauerstoff cmm	Zeit nach Herstellung der Fructoselösung	In einer Stunde von 10 ccm Lösung verbrauchter Sauerstoff cmm
1 Stunde	242	24 Stunden	320
2 Stunden	345	48 "	212
3 "	375	72 "	204
4 "	410		

Aus Tabelle I ergibt sich, daß die Geschwindigkeit der Oxydation in den ersten Stunden schnell ansteigt und dann im Laufe von Tagen langsam absinkt. Durch Interpolation kann man berechnen, daß 10 ccm der Lösung oder 200 mg Fructose nach 3 Tagen etwa 30 mg Sauerstoff verbraucht haben, das sind 15 Proz. des Fructosegewichts. Gleichzeitig hatte die Drehung der Lösung um 13 Proz. des Anfangswertes abgenommen.

Nimmt man das Maximum der Oxydationsgeschwindigkeit, 410 cmm Sauerstoff pro Stunde, und bezieht das Gewicht des verbrauchten Sauerstoffs auf das Gewicht der Fructose, so findet man, daß pro Stunde bis 0,3 Proz. des Fructosegewichts an Sauerstoff verbraucht werden.

III. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Zur Herstellung verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen benutzen wir Phosphatgemische oder Gemische von Glykokoll mit Natronlauge, und zwar Glykokoll-Natronlauge in den von *Soerensen* angegebenen Konzentrationen, Phosphat jedoch in höherer, im allgemeinen $^1/_1$-molarer Konzentration. Mischt man $^1/_1$-molare Lösungen von sekundärem und primärem Phosphat in demselben Vernältnis wie die verdünnteren (m/15) Soerensenlösungen, so erhält man nicht die gleichen Wasserstoffionenkonzentrationen, sondern die aus konzentriertem Phosphat hergestellten Lösungen sind etwas saurer als die aus verdünntem Phosphat hergestellten.

Wir haben die p_H-Werte unserer konzentrierten Phosphatlösungen nicht genauer gemessen. Im folgenden bedeutet der p_H-Wert, der neben der Zusammensetzung der Gemische angegeben ist, den Exponenten der Soerensengemische für 18°, der also nur angenähert mit dem p_H unserer Gemische, die bei 38° zur Anwendung kamen, übereinstimmt.

In dem Versuche der Tabelle II war Fructose gelöst einerseits in einem Phosphatgemisch von Blutalkalität, andererseits in Glykokoll-Natronlauge von 400- bis 1000mal höherer Alkalität. In der fast neutralen Phosphatlösung ist die Oxydationsgeschwindigkeit am

größten, die Phosphatlösung wirkt auf Fructose stärker ein als eine n/1000 Natronlauge.

Tabelle II. 38°. Gasraum Sauerstoff.

Zeit	10 ccm 2proz. Fructose in m/1 Phosphat 8 sekundär, 2 primär p_H etwa 7,4	10 ccm 2proz. Fructose in Glykokoll-Natronlauge 6 Glykokoll, 4 NaOH p_H etwa 10,1	10 ccm 2proz. Fructose in Glykokoll-Natronlauge 5 Glykokoll, 5 NaOH p_H etwa 11,3
30′	70 cmm O_2	12,4 cmm O_2	56 cmm O_2
60′	158 „ „	29,4 „ „	118 „ „
90′	266 „ „	49,5 „ „	176 „ „

In anderen Versuchen wurde die Konzentration an Phosphat (und an Fructose) konstant gehalten und nur die Konzentration der Wasserstoffionen variiert (Tabelle III und Abb. 1). Man erkennt, daß die Wirkung des Phosphats bei schwach saurer Reaktion beginnt und mit steigender Alkalität der Lösungen zunimmt.

Tabelle III. 38°. Gasraum Sauerstoff.

Zeit	5 ccm 6 proz. Fructoselösung in m/1 Phosphat *2 sekund., 8 prim.* p_H etwa 6,2	5 ccm 6 proz. Fructoselösung in m/1 Phosphat *5 sekund., 5 prim.* p_H etwa 6,8	5 ccm 6 proz. Fructoselösung in m/1 Phosphat *8 sekund. 2 prim.* p_H etwa 7,4	5 ccm 6 proz. Fructoselösung in m/1 Phosphat *9,5 sekund., 0,5 prim.* p_H etwa 8,0
30′	16 cmm O_2	41 cmm O_2	106 cmm O_2	178 cmm O_2
60′	28 „ „	89 „ „	237 „ „	392 „ „

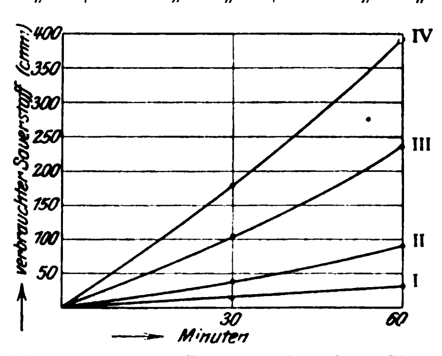


Abb. 1. 5 ccm 6proz. Fructose in 1/1 molarem Phosphat. Kurve I: p_H etwa 6,2. Kurve II: p_H etwa 6,8. Kurve III: p_H etwa 7,4. Kurve IV: p_H etwa 8,0.

IV. Einfluß der Phosphatkonzentration.

Hält man die Konzentration der Wasserstoffionen und der Fructose konstant und variiert die Konzentration des Phosphats, so steigt die Geschwindigkeit der Oxydation, und zwar etwas langsamer als die Phosphatkonzentration (Abb. 2, Tabelle IV).

Tabelle I. 38°. Gasraum Sauerst

Zeit nach Herstellung der Fructoselösung	In einer Stunde von 10 ccm Lösung verbrauchter Sauerstoff cmm	Zeit nach H... der Fru...
1 Stunde	242	
2 Stunden	345	
3 „	375	
4 „	410	

...oz. Fructose-...ung in Phosphat ...ndär, 1,5 primär
84 cmm O_2
181 „ „

Aus Tabelle I ergibt s...
dation in den ersten Stund...
Tagen langsam absinkt. ...
daß 10 ccm der Lösu...
30 mg Sauerstoff v...
gewichts. Gleich...
des Anfangswe...

Nimmt ...
Sauerstoff...
Sauerst...
Stun...
w...

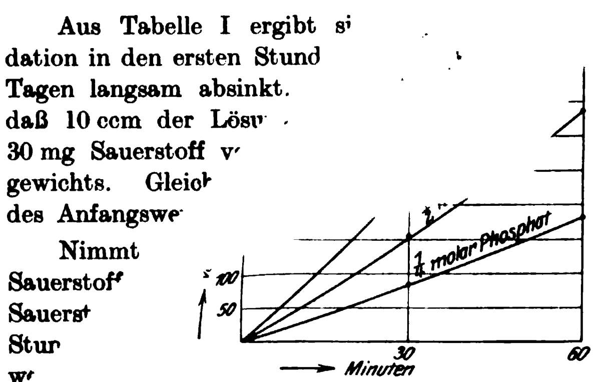


Abb. 2. 10 ccm 6 proz. Fructose in 8,5 sek., 1,5 prim. Phosphat.

Daß es sich hier um eine spezifische Wirkung der Phosphate handelt, geht daraus hervor, daß Phosphat durch andere Salze nicht ersetzt werden kann. Löst man Fructose in *verdünntem* Phosphat und stellt den hohen Salzgehalt durch andere Salze her, so beobachtet man — soweit unsere Erfahrungen reichen — entweder keine Wirkung auf die Oxydationsgeschwindigkeit oder eine Hemmung der langsamen, in dem verdünnten Phosphat vor sich gehenden Oxydation (Tabelle V). Lithiumsulfat bringt die von dem verdünnten Phosphat herrührende Wirkung sogar vollständig zum Verschwinden.

Tabelle V. 38.° Gasraum Sauerstoff.

Zeit	10 ccm 2 proz. Fructoselösung in m/10 Phosphat 9 sekund., 1 prim. —	10 ccm 2 proz. Fructoselösung in m/10 Phosphat 9 sekund., 1 prim. 25 proz. Li_2SO_4	10 ccm 2 proz. Fructoselösung in m/10 Phosphat 9 sekund., 1 prim. 25 proz. Na_2SO_4	10 ccm 2 proz. Fructoselösung in m/10 Phosphat 9 sekund., 1 prim. 25 proz. NaCl
60′	19 cmm O_2	0 cmm O_2	—	—
120′	48 „ „	0 „ „	39 cmm O_2	21 cmm O_2
180′	77 „ „	0 „ „	67 „ „	35 „ „

V. Einfluß der Fructosekonzentration.

Hält man die Konzentration der Wasserstoffionen und die Konzentration des Phosphats konstant und variiert die Konzentration der Fructose, so steigt die Geschwindigkeit der Oxydation etwa proportional der Fructosekonzentration (Abb. 3 und Tabelle VI).

Tabelle VI. 38°. Gasraum Sauerstoff.

5 ccm Fructoselösung *3 g : 100 ccm* in m/1 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär	5 ccm Fructoselösung *5,8 g : 100 ccm* in m/1 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär	5 ccm Fructoselösung *11,4 g : 100 ccm* in m/1 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär
65 cmm O_2 148 „ „	120 cmm O_2 270 „ „	220 cmm O_2 487 „ „

Abb. 3. 5 ccm Fructoselösung in $^1/_1$ molar. Phosphat (8,5 sek., 1,5 prim.).

VI. Messung der bei der Oxydation gebildeten Kohlensäure.

Unter allen von uns geprüften Bedingungen entsteht bei der Oxydation der Fructose in Phosphat Kohlensäure, und zwar — unabhängig von der Konzentration der Wasserstoffionen und der Konzentration der Fructose — immer etwa 0,3 Mol Kohlensäure auf 1 Mol absorbierten Sauerstoffs. Beispiele enthält Tab. VII, in die sowohl die beobachteten Drucke, als auch die daraus berechneten Kohlensäurewerte eingetragen sind.

Zur Erläuterung der Tabelle ist folgendes zu bemerken: Ein *Teil* der gebildeten Kohlensäure wird während des Oxydationsversuchs an den Gasraum des Atmungstroges abgegeben, der *Rest* wird von der Lösung als Bicarbonat gebunden und erscheint erst beim Ansäuern mit Schwefelsäure am Ende des Oxydationsversuchs. Je alkalischer die Lösung ist, um so mehr Kohlensäure wird chemisch gebunden, um so weniger Kohlensäure während des Oxydationsversuchs an den Gasraum des Atmungstroges abgegeben. Die alkalischen Lösungen entwickeln dementsprechend (Versuche 1 und 4) erst beim Ansäuern die Hauptmenge der Kohlensäure, die sauren Lösungen (Versuch 3) schon *vor* dem Ansäuern.

Die Berechnung geschieht nach den in dieser Zeitschrift Band 113, S. 282 gegebenen Formeln. Bezeichnen wir mit h^I und h^{II} die beim Oxydationsversuch in den Trögen I und II beobachteten Druck-

änderungen, mit $K^I_{O_2}$, $K^I_{CO_2}$ und $K^{II}_{O_2}$ $K^{II}_{CO_2}$ die zu den Trögen I und II gehörenden Gefäßkonstanten, mit x_{O_2} den Sauerstoffverbrauch, mit x_{CO_2} die an den Gasraum während des Oxydationsversuchs abgegebene Kohlensäure, so sind die verschwundenen und entstandenen Gasmengen in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = h^I K^I_{O_2} \qquad x_{CO_2} = h^{II} K^{II}_{CO_2} - x_{O_2} \frac{K^{II}_{CO_2}}{K^{II}_{O_2}}.$$

Sind ferner H^{II} und H^{III} die Drucke, die *beim Ansäuern* der Lösungen entstehen, so sind die chemisch gebundenen Kohlensäuremengen in Kubikmillimetern zu Beginn des Oxydationsversuchs: $H^{III} K^{III}_{CO_2}$, am Ende des Oxydationsversuchs: $H^{II} K^{II}_{CO_2}$, und die durch Oxydation der Fructose gebildete Kohlensäuremenge ist

$$x_{CO_2} + H^{II} K^{II}_{CO_2} - H^{III} K^{III}_{CO_2}.$$

Tabelle VII. 38°. Gasraum Sauerstoff.

Nr.	Zusammensetzung der Fructoselösung	Trog I. Hauptraum: 2 ccm Fructoselösung. Einsatz: 1 ccm 5 proz. Kalilauge. v_F = 3 ccm, v_G = 26 ccm, K_{O_2} 2,3	Trog II. Hauptraum: 2 ccm Fructoselösung. Einsatz: 1,5 ccm 3 f. n. Schwefelsäure. v_F = 3,5 ccm, v_G = 25,5 ccm, K_{O_2} = 2,25, K_{CO_2} = 2,44	Trog III. Hauptraum: 2 ccm Fructoselösung. Einsatz: 1,5 ccm 3 f. n. Schwefelsäure. v_F = 3,5 ccm, v_G = 26,5 ccm, K_{CO_2} = 2,53	$\frac{CO_2}{O_2}$
1	6 g Fructose, 100 ccm m/1 sekundäres Phosphat. p_H undefiniert	Nach 210 Min. — 418 mm. x_{O_2} = — 940 cmm	Nach 210 Min. — 394 mm. x_{CO_2} = + 60 cmm. Nach Einkippen d. Schwefelsäure: + 102 mm = + 249 cmm CO_2	Nach Einkippen d. Schwefelsäure zur Zeit t^0: + 8 mm = + 23 cmm CO_2	$\frac{60 + 249 - 23}{940} = 0,31$
2	12 g Fructose, 80 ccm sekundäres, 20 ccm primäres m/1 Phosphat. p_H etwa 7,4	Nach 160 Min. — 234 mm. x_{O_2} — 539 cmm	Nach 160 Min. — 192 mm. x_{CO_2} = + 113 cmm. Nach Einkippen d. Schwefelsäure: + 25 mm = + 61 cmm CO_2	Nach Einkippen d. Schwefelsäure zur Zeit t^0: + 3 mm = + 7,6 cmm CO_2	$\frac{113 + 61 - 8}{539} = 0,31$
3	12 g Fructose, 50 ccm sekundäres, 50 ccm primäres m/1 Phosphat. p_H etwa 6,8	Nach 360 Min. — 274 mm. x_{O_2} = — 630 cmm	Nach 360 Min. — 214 mm. x_{CO_2} = + 159 cmm. Nach Einkippen d. Schwefelsäure: + 9 mm = + 22 cmm CO_2	Nach Einkippen d. Schwefelsäure zur Zeit t^0: 0	$\frac{159 + 22}{630} = 0,29$
4	5 g Fructose, 95 ccm sekundäres, 5 ccm primäres m/1 Phosphat. p_H etwa 8,0	Nach 300 Min. — 380 mm. x_{O_2} = — 870 cmm	Nach 300 Min. — 330 mm. x_{CO_2} = + 145 cmm. Nach Einkippen d. Schwefelsäure: + 85 mm = + 208 cmm CO_2	Nach Einkippen d. Schwefelsäure zur Zeit t^0 + 21 mm = + 53 cmm CO_2	$\frac{145 + 208 - 53}{870} = 0,35$

Jacques Loeb †.

Aus Amerika kommt die Trauernachricht, daß *Jacques Loeb* am 11. Februar dieses Jahres plötzlich verstorben ist.

Der große Gelehrte, der am 7. April 1859 zu Mayen geboren war, wurde nach seiner Ausbildung in Berlin 1886 Assistent am physiologischen Institut zu Würzburg; 1888 ging er in gleicher Stellung nach Straßburg. Entscheidend für seine Lebensarbeit wurde die Tätigkeit an der zoologischen Station zu Neapel, die er 1890 begann. Zwei Jahre später übernahm er eine Professur an der Universität Chicago und wirkte sodann in Berkeley (Californien). Im Jahre 1910 wurde er an das Rockefeller-Institut nach New York berufen, dessen biologische Abteilung er leitete.

Mehr als 400 Mitteilungen und neun Bücher legen Zeugnis von der rastlosen Forschertätigkeit *Loebs* ab. Von der Kühnheit seiner Gedanken und der Genialität seines Schaffens haben die verschiedensten Wissenszweige unendlichen Nutzen gezogen. Die Biochemie, die Biologie, die physikalische Chemie, die praktische Medizin, die Psychologie und Philosophie verdanken ihm weitgehendste Förderungen. Sein Eingreifen in die Wissenschaft bedeutet für viele Disziplinen geradezu einen Markstein. An dieser Stelle sei nur erinnert an seine Arbeiten über den Geo- und Heliotropismus der Tiere sowie über die Möglichkeiten der Heteromorphose und Regeneration. Besondere Beachtung hat er dem Studium der wichtigen Rolle geschenkt, die den Salzen für den Ablauf des Daseins zukommt. Seine Beiträge zur Lehre vom Ionenantagonismus haben revolutionierend gewirkt, und sie haben

ihn auch zu seinen berühmten Versuchen über die Entwicklungserregung im tierischen Ei mit physikalisch-chemischen Agenzien (künstliche Parthenogenese) geführt. *Loebs* Untersuchungen über die psychischen Fähigkeiten der Tiere haben, weit über die Fachgrenzen hinausragend, Einfluß auf die Gebiete der Psychologie und Philosophie geübt. Seine Studien über die kolloidalen Eigenschaften der Proteine sind von gleicher Bedeutung für die Biologie wie für die physikalische Chemie geworden, aber leider durch den allzu frühen Tod *Loebs* nicht zu vollem Abschluß gelangt.

Jacques Loeb ist es vergönnt gewesen, unvergängliche Fundamente der biologischen Forschung zu errichten und Fluchtlinien für lange Zeit zu entwerfen. Die ganze wissenschaftliche Welt betrauert den Heimgang dieser einzigartigen und wahrhaft großen Persönlichkeit.

C. N.

Über die Einwirkung von Stoffwechsel-Endprodukten auf die Pflanzen.

III. Mitteilung: Einwirkung N-freier pflanzlicher Stoffwechsel-Endprodukte auf die Keimung von Samen: Ätherische Öle, Terpene u. a.

Von

Wilhelm Sigmund (Prag).

(Aus der deutschen technischen Hochschule in Prag.)

(Eingegangen am 16. Februar 1924.)

Bei den Versuchen mit den ätherischen Ölen, Terpenen und anderen Verbindungen, die als Bestandteile von ätherischen Ölen vorkommen, wurde dieselbe Versuchsanordnung beibehalten, wie sie bei den früheren Untersuchungen[1]) angewandt wurde, auch die Versuchsobjekte blieben dieselben. Doch konnten hier wegen der Unlöslichkeit der genannten Stoffe in Wasser äquimolekulare Lösungen nicht mehr zur Einwirkung gelangen.

Bei den Versuchen über die Einwirkung der Dämpfe der oben angeführten Verbindungen auf die Keimung von Samen wurden die Keimschalen unter tubulierte Glasglocken gebracht, deren Tubus lose bedeckt war. Die flüchtige Substanz befand sich in einem kleinen Schälchen oberhalb der Keimschale. Beim Kontrollversuch befand sich die Keimschale ebenfalls unter einer lose bedeckten tubulierten Glasglocke von gleicher Größe und denselben Versuchsbedingungen.

Anethol, p-Propenyl-methoxyphenol,

$$CH_3O\langle\;\rangle CH{=}CH{-}CH_3.$$

Anethol hat in einer Menge von 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit bei Wicken die Keimungsenergie geschwächt, ohne die Keimprozente wesentlich zu verändern; bei Weizen und noch mehr bei Raps wurden sowohl die Keimungsenergie als auch die Keimprozente herabgesetzt.

[1]) Diese Zeitschr. 62, 299 u. 339.

Das Stengelwachstum war durchweg mehr oder weniger verzögert, die Wurzelbildung benachteiligt (VI, 2). In Dampfform, 0,04 g Anethol auf 8037 ccm Luftraum bei siebentägiger Einwirkungsdauer der Dämpfe, hat es die Keimungsenergie der Versuchssamen nicht verändert; die Keimprozente wurden bei Weizen nicht beeinflußt, bei Wicken und Raps ein wenig vermindert. Die Stengel blieben in ihrer Entwicklung zurück, relativ am meisten bei Weizen; das Wurzelsystem war schwächer entwickelt als beim Kontrollversuch (XI, 2).

Anisaldehyd, p-Methoxybenzaldehyd,



Anisaldehyd, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, hat die Keimungsenergie durchweg geschwächt, die Keimprozente waren bei Wicken nahezu normal, bei Weizen etwas, bei Raps wesentlich herabgesetzt. Die Entwicklung der Stengel war verzögert, die Wurzelbildung stark affiziert (VI, 3). Die Dämpfe haben in einer Menge von 0,04 g auf einen Luftraum von 8037 ccm bei siebentägiger Einwirkungsdauer bis auf eine geringe Verminderung der Keimungsenergie und der Keimprozente den Verlauf der Keimung nicht wesentlich beeinflußt (XI, 3).

Anisöl von Pimpinella Anisum L.

Anisöl hat beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) die Keimungsenergie ziemlich stark geschwächt, die Keimprozente dagegen weniger benachteiligt; das Stengelwachstum blieb zurück, die Wurzelbildung wurde geschädigt (II, 2).

Anissäure, p-Methoxybenzoesäure,

$$CH_3O\langle\quad\rangle COOH.$$

0,2 Proz. Anissäure in der Quellungsflüssigkeit haben bei allen Versuchssamen die Keimungsenergie herabgesetzt, insbesondere bei Weizen; die Keimprozente wurden ebenfalls vermindert, am meisten bei Raps. Das Stengelwachstum war bei Weizen und Raps nahezu normal, bei Wicken verzögert; die Entwicklung der Wurzeln wurde etwas benachteiligt (VI, 4).

Apiol, (3, 4)-Methylen-(2, 5)-dimethoxy-allylbenzol,

$$C_6H(O_2CH_2)(OCH_3)_2 \cdot C_3H_5.$$

Apiol hat in Konzentrationen von 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken nicht verändert, bei Weizen und Raps dagegen beide vermindert. Die Stengelbildung wurde sehr stark geschädigt, auch auf die Entwicklung der Wurzeln äußerte es eine heftige Giftwirkung (VII, 2).

Benzaldehyd (Bittermandelöl),

$$C_6H_5 \cdot COH.$$

Benzaldehyd setzte beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) die Keimungsenergie und die Keimprozente wesentlich herab, am meisten bei Weizen, dann bei Raps und relativ am wenigsten bei Wicken; das Stengelwachstum

blieb sehr zurück, die Wurzeln wurden besonders stark geschädigt (V, 2). Auch die Dämpfe des Benzaldehyds wirkten stark toxisch; in einer Menge von 0,5 g Benzaldehyd auf 8037 ccm Luftraum bei dreitägiger Einwirkungsdauer tötete es die Keimlinge aller Versuchssamen; selbst nach 10 Tagen zeigte sich noch keine Spur von Keimung. Auch in starker Verdünnung, 0,05 g auf 8037 ccm Luftraum, und dreitägiger Einwirkungsdauer beeinflußten die Benzaldehyddämpfe den Verlauf der Keimung sehr nachteilig. Die Keimungsenergie und die Keimprozente wurden sehr vermindert, insbesondere bei Raps, relativ weniger bei Weizen; das Stengelwachstum wurde bei Wicken und Weizen sehr verzögert, bei Raps verkümmerten die Stengel alsbald. Die Wurzeln waren bei allen Versuchssamen mehr oder weniger verkümmert (VIII, 2).

Bergamottöl von Citrus Bergamia Risso.

Bergamottöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, schwächte die Keimungsenergie, ohne die Keimprozente wesentlich zu vermindern. Die Entwicklung der Stengel wurde nicht auffallend beeinflußt, das Wachstum der Wurzeln etwas benachteiligt (II, 3).

Borneol von Dryobalanops Camphora Colebr.,

$$
\begin{array}{ccccc}
CH_2 & — & CH & — & CH_3 \\
| & & | & & | \\
| & CH_3 — & C & — CH_3 & | \\
| & & | & & | \\
CH_2 & — & C & — & CHOH \\
 & & | & & \\
 & & CH_3 & &
\end{array}
$$

Borneol, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit: Keimungsenergie und Keimprozente waren bei Wicken normal, bei Weizen und noch mehr bei Raps herabgesetzt; das Wachstum der Wurzeln und Stengel wurde etwas benachteiligt (IV, 2). Die Dämpfe des Borneols, 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und neuntägiger Einwirkungsdauer, haben die Keimungsenergie ein wenig beschleunigt, die Keimprozente erhielten sich auf normaler Höhe; das Stengelwachstum war mehr oder weniger verzögert, am meisten bei Raps, auch die Entwicklung der Wurzeln blieb gegen den Kontrollversuch zurück (XVI, 3). Doch sind von der angewandten Menge nur Spuren verdunstet.

Campher von Laurus Camphora L.,

$$
\begin{array}{ccccc}
CH_2 & — & CH & — & CH_2 \\
| & & | & & | \\
| & CH_3 — & C & — CH_3 & | \\
| & & | & & | \\
CH_2 & — & C & — & CO \\
 & & | & & \\
 & & CH_3 & &
\end{array}
$$

0,2 Proz. Campher in der Quellungsflüssigkeit haben die Keimungsenergie bei Wicken wenig, bei Weizen mehr, bei Raps am meisten herabgesetzt; die Keimprozente erreichten bei Wicken nahezu die des Kontrollversuchs, bei Weizen wurden sie ein wenig, bei Raps bedeutend vermindert. Das Stengelwachstum blieb gegen das normale überall zurück; die Entwicklung der Wurzeln wurde benachteiligt (IV, 3). Die Dämpfe des Camphers

haben in einer Menge von 0,2 g auf 8037 ccm Luftraum und neuntägiger Einwirkungsdauer die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken wenig, bei Weizen und Senf stärker beeinflußt; auf die Entwicklung der Wurzeln und Stengel äußerten sie eine starke Giftwirkung. In einer Menge von 0,04 g auf denselben Luftraum und derselben Einwirkungsdauer war die schädigende Wirkung eine geringere, die Keimungsenergie wurde bei Wicken gar nicht, bei Weizen und Senf etwas vermindert, die Keimprozente wurden nicht affiziert. Die Stengel blieben in ihrem Wachstum zurück, relativ am wenigsten bei Wicken, stärker bei Weizen und Senf; die Entwicklung der Wurzeln war durchweg verzögert und geschwächt (XVI, 2).

Es wurde vergleichsweise auch der synthetische Campher in seiner Einwirkung auf die Keimung untersucht.

Der synthetische Campher wirkte bei den Quellungsversuchen auf dieselben Versuchsobjekte und unter den gleichen Versuchsbedingungen ungefähr dem natürlichen Campher gleich (IV, 4). In Dampfform dagegen äußerste der synthetische Campher bei gleichen Versuchsbedingungen eine intensivere Giftwirkung auf dieselben Versuchssamen als der natürliche Campher (XVI, 4).

Carvacrol,

$$CH_3\langle C_6H_3(OH)\rangle CH\langle{CH_3 \atop CH_3}.$$

Carvacrol wirkte beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) tödlich auf fast alle Keimlinge; Weizen keimte überhaupt nicht, von Wicken und Raps keimten nur 4 bzw. 5 Proz., die Keimpflänzchen verkümmerten aber alsbald (VII, 3). Die Dämpfe des Carvacrols, 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und siebentägiger Einwirkungsdauer, äußerten dagegen eine viel geringere Giftwirkung; Keimungsenergie und Keimprozente wurden nur wenig beeinflußt, die Wurzeln blieben in ihrer Entwicklung gegen den Kontrollversuch zurück, das Stengelwachstum war mehr oder weniger verzögert (XIII, 2).

Carvon,

$$CH_3.C\langle{CH.CH_2 \atop CO.CH_2}\rangle CH.C\langle{CH_2 \atop CH_3}$$

Carvon, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, erwies sich als ein heftiges Gift für den Keimling. In den ersten 3 Tagen kam es überhaupt nicht zur Keimung, am vierten Versuchstage keimten 19 Proz. Wicken (gegen 89 Proz. beim Kontrollversuch) und erst am siebenten Versuchstage wurde an je 3 Proz. Weizen und Raps eine verkümmerte Keimung beobachtet; auch die Wickenkeimpflänzchen blieben in ihrer Entwicklung sehr zurück und verkümmerten schließlich (III, 2).

Cedernöl von Juniperus virginiana L.

Cedernöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie aller Versuchssamen herab, die Keimprozente blieben jedoch intakt. Das Wachstum der Wurzeln und Stengel blieb anfangs etwas zurück, näherte sich aber immer mehr und mehr dem des Kontrollversuchs (I, 2).

Citral,

$$CH_3{-}\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}}{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}}{=}CH{-}COH.$$

Citral, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, tötete die Keimlinge des Weizens und der Rapssamen; bei Wicken wurden die Keimungsenergie und die Keimprozente wesentlich vermindert, das Wurzelsystem bedeutend geschädigt und das Stengelwachstum sehr verzögert (III, 3).

Citronenöl von Citrus Limonum Risso.

Citronenöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, bewirkte eine Schwächung der Keimungsenergie, insbesondere bei Wicken und Raps, die Keimprozente dagegen erreichten die des Kontrollversuchs. Das Wurzelsystem war etwas schwächer entwickelt als beim Kontrollversuch, das Wachstum der Stengel jedoch war nahezu normal (I, 3).

Cymol, p-Methyl-isopropyl-benzol,

$$CH_3\langle C_6H_4 \rangle CH \langle {CH_3 \atop CH_3} .$$

Cymol, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Die Keimungsenergie wurde bei allen Versuchsobjekten geschwächt, am meisten bei Raps; die Keimprozente waren bei Wicken normal, bei Weizen und Raps etwas vermindert. Die Entwicklung der Wurzeln und Stengel war dem Kontrollversuch ungefähr gleich (III, 4).

Eucalyptol, Cineol,

$$CH_3.C \langle {CH_2{-}CH_2 \atop CH_2{-}CH_2} \rangle CH.C \langle {CH_3 \atop CH_3} . \quad (\text{C und C über O verbunden})$$

Eucalyptol, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, schwächte die Keimungsenergie, und zwar bei Raps mehr als bei Wicken und Weizen; die Keimprozente waren bei Wicken nahezu normal, bei Weizen und Raps vermindert. Das Stengelwachstum war dem Kontrollversuch fast gleich, die Entwicklung der Wurzeln etwas benachteiligt (III, 5).

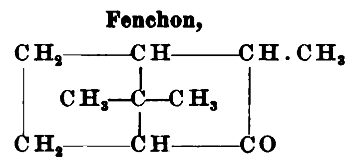
Eucalyptusöl von Eucalyptusarten.

0,2 Proz. Eucalyptusöl in der Quellungsflüssigkeit setzten die Keimungsenergie der Versuchssamen herab, ohne jedoch die Keimprozente wesentlich zu beeinflussen. Das Wachstum der Wurzeln und Stengel war nahezu normal (II, 4).

Fenchelöl von Foeniculum vulgare Gärtn.

Fenchelöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, bewirkte bei Wicken eine wesentliche Herabsetzung der Keimungsenergie, die Keimprozente selbst erreichten nahezu die normale Höhe; Weizen erlitt eine Schwächung der Keimungsenergie und eine geringe Verminderung der Keimprozente; Raps wurde sowohl in der Keimungsenergie als auch in den Keimprozenten stark benachteiligt. Das Wurzelsystem war bei allen Versuchsobjekten mehr oder weniger geschädigt, das Stengelwachstum durchweg verzögert (I, 4).

Fenchon,



Fenchon, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Die Keimungsenergie und die Keimprozente waren bei Wicken nahezu normal, bei Weizen wurden sie wenig, bei Raps bedeutend herabgesetzt. Die Entwicklung der Wurzeln wurde benachteiligt, die Stengel blieben in ihrem Wachstum gegen den Kontrollversuch zurück (IV, 5).

Geraniumöl von Andropogon Schoenanthus L.

Geraniumöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, hat bei Wicken die Keimungsenergie, nicht aber die Keimprozente beeinträchtigt, bei Weizen und Raps aber wurden beide wesentlich vermindert. Die Entwicklung der Stengel war verzögert, die Wurzelbildung ziemlich stark geschädigt (V, 3).

Knoblauchöl von Allium sativum L.

Knoblauchöl hat beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken nicht beeinflußt, bei Weizen und Raps dagegen wesentlich herabgesetzt. Das Stengelwachstum wurde nicht beeinträchtigt, die Wurzelbildung war etwas geschwächt (V, 4). In Dampfform, 0,08 g Knoblauchöl auf 8037 ccm Luftraum und dreitägiger Einwirkungsdauer der Dämpfe, hat es die Keimungsenergie und die Keimprozente der Versuchssamen mehr cder weniger vermindert. Das Stengelwachstum war verzögert, insbesondere bei Wicken, das Wurzelsystem wesentlich schwächer als beim Kontrollversuch (X, 2). Wirkte der Dampf in größerer Menge und durch längere Zeit, 0,2 g Knoblauchöl auf 8037 ccm Luftraum und achttägiger Einwirkungsdauer, so war die Giftwirkung eine intensivere; die Keimungsenergie aller Versuchssamen wurde geschwächt, die Keim prozente erreichten nur bei Wicken annähernd die normale Höhe, bei Weizen und noch mehr bei Raps wurden sie sehr herabgesetzt. Das Wurzel- und Stengelwachstum wurde stark affiziert (IX, 2).

Kümmelöl von Carum Carvi L.

Kümmelöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Die Keimungsenergie und die Keimprozente wurden bei allen Versuchsobjekten herabgesetzt, und zwar am meisten bei Raps, weniger bei Weizen und relativ am wenigsten bei Wicken. Die Entwicklung der Wurzeln wurde durchweg sehr geschädigt, die Stengel blieben in ihrem Wachstum zurück; besonders stark wurden die Rapskeimlinge affiziert, die wenigen Keimpflänzchen verkümmerten schließlich (II, 5).

Lavendelöl von Lavandula vera D. C.

Lavendelöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, war bei Wicken ohne Einfluß auf die Keimungsenergie und die Keimprozente, bei Weizen und Raps wurden beide vermindert. Die Entwicklung der Stengel blieb hinter der normalen etwas zurück, das Wurzelsystem war ein wenig benachteiligt (V, 5).

Limonen,

$$CH_3 . C\begin{matrix}\diagup CH—CH_2\diagdown \\ \diagdown CH_2—CH_2\diagup\end{matrix}CH . C\begin{matrix}\diagup CH_2 \\ \diagdown CH_3\end{matrix} .$$

Rechts-Limonen, Carven.

Rechts-Limonen, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Keimungsenergie und Keimprozente waren bei Wicken intakt, bei Weizen und insbesondere bei Raps wurde die Keimungsenergie geschwächt, die Keimprozente dagegen wurden nicht wesentlich beeinflußt. Die Wurzeln blieben in ihrer Entwicklung etwas zurück; die Stengel entwickelten sich bei Wicken und Weizen ungefähr normal, bei Raps etwas langsamer (III, 8). Die Dämpfe des Rechts-Limonen haben in einer Menge von 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum bei sechstägiger Einwirkungsdauer die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken und Weizen gar nicht, bei Raps ein wenig beeinflußt. Das Wachstum der Wurzeln und Stengel blieb gegenüber dem Kontrollversuch etwas zurück (XIV, 2).

Links-Limonen.

Links-Limonen, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Keimungsenergie und Keimprozente waren bei Wicken normal, bei Weizen etwas, bei Raps stark herabgesetzt. Das Stengelwachstum stand bei Wicken und Weizen dem Kontrollversuch nur wenig nach, bei Raps dagegen war es verzögert; stärker benachteiligt erschien das Wurzelsystem (III, 7). Ein Vergleich der Tabelle zeigt, daß Links-Limonen etwas nachteiliger auf die Versuchssamen, insbesondere auf Raps, wirkte als Rechts-Limonen. Die Dämpfe des Links-Limonen wirkten in einer Menge von 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und bei sechstägiger Einwirkungsdauer, also unter denselben Versuchsbedingungen wie bei Rechts-Limonen dem letzteren ungefähr gleich, doch war bei Links-Limonen das Wurzelsystem schwächer entwickelt und das Stengelwachstum mehr verzögert als bei Rechts-Limonen (XIV, 3).

Linalool,

$$\begin{matrix} CH_3—C=CH—CH_2—CH_2—C(OH)—CH—CH_2. \\ \quad | \qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \quad CH_3 \qquad\qquad\qquad\quad CH_3 \end{matrix}$$

Linalool, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, bewirkte eine Verminderung der Keimungsenergie und der Keimprozente bei Weizen und namentlich bei Raps, bei Wicken wurde wohl die Keimungsenergie ein wenig geschwächt, die Keimprozente aber blieben intakt. Das Stengelwachstum war etwas verzögert, die Wurzelbildung benachteiligt (IV, 6).

Menthol,

$$CH_3 . CH<\begin{matrix}CH_2—CHOH \\ CH_2—CH_2—\end{matrix}>CH . CH<\begin{matrix}CH_3 \\ CH_3\end{matrix}.$$

Menthol, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Bei Wicken und Weizen wurden Keimungsenergie und Keimprozente nur wenig beeinflußt, bei Raps dagegen waren beide wesentlich vermindert. Das Stengelwachstum war anfangs verzögert, erreichte aber nach und nach die normale Höhe; die Entwicklung der Wurzeln blieb gegen die des Kontrollversuchs etwas zurück (VI, 5).

Nelkenöl von Cariophyllus aromaticus L.

Nelkenöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, tötete sämtliche Weizenkeimlinge, Raps und Wicken wurden sowohl in der Keimungsenergie und den Keimprozenten als auch in der Entwicklung der Wurzeln und Stengel sehr geschädigt, und zwar Raps mehr als Wicken (I, 5).

Pfefferminzöl von Mentha piperita L.

Pfefferminzöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, bewirkte eine Schwächung der Keimungsenergie aller Versuchssamen, insbesondere bei Weizen und Raps; die Keimprozente erreichten bei Wicken die des Kontrollversuchs, bei Weizen und noch mehr bei Raps waren sie vermindert. Das Wurzelsystem wurde wesentlich benachteiligt, das Stengelwachstum verzögert (I, 6).

Pinen,

```
CH2 ──── C ════ CH
 |       |       |
 |  CH3─ C ─CH3  |
 |       |       |
CH2 ──── C ──── CH2
         |
        CH3
```

Links-Pinen.

Links-Pinen setzte beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) die Keimungsenergie und Keimprozente etwas herab, das Stengelwachstum erreichte bei Wicken und Weizen die normale Höhe, bei Raps war es verzögert; das Wurzelsystem war ein wenig geschwächt (III, 9). Die Dämpfe des Links-Pinen, 0,4 g auf 8037 ccm Luftraum und sechstägiger Einwirkungsdauer, übten eine stark toxische Wirkung auf den Verlauf der Keimung aus, und zwar hauptsächlich auf die Entwicklung der Wurzeln und Stengel, die mehr oder weniger verkümmerten; dagegen wurden die Keimungsenergie und die Keimprozente nur wenig affiziert (XV, 3).

Rechts-Pinen.

Rechts-Pinen, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Gegen Weizen verhielt es sich ungefähr wie Links-Pinen, auf Wicken und Raps wirkte es etwas weniger nachteilig, indem die Keimprozente vermehrt und das Stengelwachstum etwas beschleunigter waren (III, 8). In Dampfform war unter sonst gleichen Bedingungen zwischen Rechts- und Links-Pinen kein auffallender Unterschied bemerkbar (XV, 2).

Rautenöl von Ruta graveolens L.

Rautenöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Die Keimungsenergie wurde wesentlich geschwächt, und zwar in zunehmender Reihenfolge bei Wicken, Weizen und Raps; die Keimprozente waren bei Wicken nahezu normal, bei Weizen und Raps vermindert. Die Wurzeln und Stengel blieben in ihrem Wachstum gegenüber dem Kontrollversuch etwas zurück (II, 6).

Rosmarinöl von Rosmarinus officinalis L.

Rosmarinöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit. Die Keimungsenergie war überall herabgesetzt, am meisten bei Raps; die Keimprozente

blieben bei Wicken und Weizen etwas, bei Raps bedeutend zurück. Das Wurzelsystem erlitt eine starke Schädigung, das Stengelwachstum wurde mehr oder weniger verzögert (II, 7).

Safrol,

$$\mathrm{H_2C{<}^{O}_{O}{>}C_6H_3{-}CH_2 . CH : CH_2}.$$

Safrol, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, verminderte etwas die Keimungsenergie der Wicken, ohne die Keimprozente zu beeinflussen, bei Weizen und Raps wurden beide wesentlich vermindert. Das Stengelwachstum wurde bei Wicken und Weizen ziemlich stark verzögert, bei Raps war die Verzögerung nur in den ersten Versuchstagen bemerkbar; die Wurzeln erlitten durchweg eine intensive Schädigung (VII, 4). Die Safroldämpfe, 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und siebentägiger Einwirkungsdauer, waren fast ohne Einfluß auf die Keimungsenergie und die Keimprozente der Wicken, bei Weizen und noch mehr bei Raps wurden sie herabgesetzt. Die Entwicklung der Stengel wurde durchweg wesentlich beeinträchtigt; die Wurzelbildung stark affiziert (XII, 2).

Salicylaldehyd,

$$C_6H_4{<}^{OH\ 1}_{COH\ 2}.$$

Salicylaldehyd hat beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) die Keimprozente und die Keimungsenergie bei Wicken wesentlich vermindert, am siebenten Versuchstage keimten nur 24 Proz. gegen 96 Proz. beim Kontrollversuch, die Keimpflänzchen verkümmerten alsbald; Weizen und Raps gelangten überhaupt nicht zur Keimung. In Dampfform wirkte Salicylaldehyd in einer Menge von 0,5 g auf 8037 ccm Luftraum und dreitägiger Einwirkungsdauer tödlich auf sämtliche Keimlinge. Auch bei Anwendung von 0,05 g Salicylaldehyd unter denselben Versuchsbedingungen war die Giftwirkung noch eine große, Keimungsenergie und Keimprozente wurden sehr stark herabgedrückt, die wenigen Keimpflänzchen waren mehr oder weniger verkümmert (VIII, 3).

Salicylsäuremethylester,

$$C_6H_4{<}^{OH}_{COOCH_3}.$$

Salicylsäuremethylester, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, schädigte die Keimungsenergie und die Keimprozente der Versuchssamen, am meisten bei Raps, dann bei Weizen, relativ weniger bei Wicken. Das Stengelwachstum blieb bei Wicken und Weizen gegen das normale etwas zurück, bei Raps verkümmerten die Stengel mehr oder weniger; das Wurzelsystem erlitt eine bedeutende Schädigung, insbesondere bei Raps (V, 9).

Senföl von Sinapis nigra L.

Senföl erwies sich als ein heftiges Gift für die Versuchssamen. Beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) tötete es alle Weizen- und Rapskeimlinge, bei Wicken setzte es die Keimungsenergie und die Keimprozente sehr herab, und die wenigen Keimpflänzchen verkümmerten schließlich (V, 6). In Dampfform, 0,08 g Senföl auf 8037 ccm Luftraum und dreitägiger Ein-

wirkungsdauer, verhinderte es die Keimung sämtlicher Versuchssamen (X, 3). Eine ähnliche Wirkung äußerten die Senföldämpfe noch bei Anwendung einer Menge von 0,04 g Senföl auf 8037 ccm Luftraum und 48stündiger Einwirkungsdauer. Es gelangten nur 3 Proz. Weizen, und zwar erst am sechsten Versuchstage zu einer verkümmerten Keimung, Wicken und Raps zeigten selbst nach 10 Tagen noch keine Spur von Keimung.

Styrol,

$$C_6H_4.CH = CH_2.$$

0,2 Proz. Styrol in der Quellungsflüssigkeit ergaben, daß die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken gar nicht, bei Weizen und Raps dagegen erheblich herabgesetzt wurden. Die Entwicklung der Wurzeln und Stengel war anfangs verzögert, verlief aber später nahezu normal (VII, 5).

Terpentinöl von Pinus silvestris L.

Terpentinöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie bei Wicken ein wenig, bei Weizen mehr und am meisten bei Raps herab; die Keimprozente erreichten bei Wicken und Weizen die des Kontrollversuchs, bei Raps blieben sie etwas zurück. Das Wurzelsystem wurde wenig affiziert, das Stengelwachstum war bei Wicken und Weizen ungefähr normal, bei Raps verzögert (I, 7). Die Dämpfe des Terpentinöls haben in einer Menge von 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und bei neuntägiger Einwirkungsdauer die Keimungsenergie und die Keimprozente kaum beeinflußt, dagegen wurde die Entwicklung der Wurzeln und Stengel sehr benachteiligt.

Terpineol,

$$CH_3—C\begin{matrix}\diagup CH—CH_2 \diagdown \\ \diagdown CH_2—CH_2 \diagup\end{matrix}CH—C(OH)\begin{matrix}\diagup CH_3 \\ \diagdown CH_3\end{matrix}.$$

Durch Einwirkung von 0,2 Proz. Terpineol in der Quellungsflüssigkeit wurde die Keimungsenergie durchweg geschwächt, die Keimprozente waren nur bei Wicken nahezu normal, bei Weizen und Raps wesentlich vermindert. Die Stengel blieben in ihrer Entwicklung zurück, noch mehr geschädigt wurden das Wurzelsystem (III, 10).

Terpinhydrat,

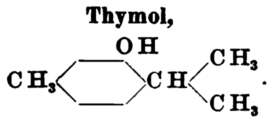
$$CH—C(OH)<\begin{matrix}CH_2—CH_2OH \\ CH_2—CH_2——\end{matrix}\!\!\nearrow CH_2—C(OH)<\begin{matrix}CH_3 \\ CH_3\end{matrix} + H_2O.$$

Terpinhydrat erwies sich beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) als nahezu unschädlich für die Versuchssamen (IV, 7). Seine Dämpfe, 0,2 g auf 8037 ccm Luftraum bei sechstägiger Einwirkungsdauer, haben die Keimungsenergie und die Keimprozente gar nicht, das Wachstum der Stengel und Wurzeln ein wenig benachteiligt.

Thymianöl von Thymus vulgaris L.

Thymianöl, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, hat die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken und Weizen etwas, bei Raps dagegen stark geschwächt. Das Stengelwachstum blieb gegen den Kontrollversuch zurück, die Entwicklung der Wurzeln wurde verzögert (V, 7).

Thymol,



Thymol äußerte beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) eine heftige Giftwirkung auf die Versuchssamen, Weizen gelangte überhaupt nicht zur Keimung, einzelne Wicken- und Rapskeimlinge verkümmerten alsbald (VII, 6). Viel geringer war die Wirkung der Dämpfe des Thymols (0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und siebentägiger Einwirkungsdauer) auf die Versuchsobjekte. Keimungsenergie und Keimprozente wurden nur in geringem Maße vermindert; das Stengelwachstum war relativ wenig verzögert, nur das Wurzelsystem wurde etwas mehr affiziert (XIII, 3).

Valeraldehyd, iso-,

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} > CH . CH_2 . COH.$$

0,2 Proz. Valeraldehyd in der Quellungsflüssigkeit haben den Keimungsprozeß nur wenig beeinflußt. Keimungsenergie und Keimprozente waren bei Wicken und Weizen normal, nur bei Raps wurden sie vermindert. Das Wachstum der Wurzeln und Stengel war zwar anfangs verzögert, näherte sich aber immer mehr und mehr dem des Kontrollversuchs (VII, 7).

Vanillin, 3-Methoxyläther des Protocatechualdehyds,

$$HOC\langle \bigcirc \rangle OH. \quad (OCH_3)$$

Vanillin, 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie und die Keimprozente der Versuchssamen herab, relativ am wenigsten bei Weizen, am meisten bei Raps. Die Entwicklung der Wurzeln und Stengel war durchweg verzögert (VI, 6).

Wacholderbeeröl von Juniperus communis L.

Wacholderbeeröl hat in einer Menge von 0,2 Proz. in der Quellungsflüssigkeit die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken nicht beeinflußt, bei Weizen und noch mehr bei Raps dagegen herabgesetzt. Die Entwicklung der Stengel wurde bei Weizen und Wicken fast gar nicht, bei Raps ein wenig vermindert; die Wurzelbildung etwas benachteiligt (V, 8).

Zimtaldehyd,

$$\langle \bigcirc \rangle CH:CH.COH.$$

Zimtaldehyd erwies sich beim Quellungsversuch (0,2 Proz.) als ein besonders heftiges Gift für den Keimling, es verhinderte die Keimung fast sämtlicher Versuchssamen (VII, 8). In Dampfform, 0,04 g auf 8037 ccm Luftraum und siebentägiger Einwirkungsdauer war seine Wirkung eine relativ schwache. Keimungsenergie und Keimprozente wurden bei Wicken und Weizen unbedeutend und nur bei Raps stärker herabgesetzt; das Stengelwachstum wurde fast gar nicht beeinflußt, die Wurzelbildung ein wenig beeinträchtigt (XII, 3).

Zusammenfassung der Resultate.

Ätherische Öle. Von den untersuchten ätherischen Ölen übte das Senföl die stärkste toxische Wirkung aus, es tötete sowohl in der Quellungsflüssigkeit als auch in Dampfform die Keimlinge aller Versuchssamen. Die nächst stärkste Giftwirkung äußerten das Nelkenöl und das Kümmelöl. Ersteres tötete sämtliche Weizenkeimlinge, letzteres wirkte auf fast alle Rapskeimlinge tödlich, aber auch die übrigen Versuchssamen wurden heftig affiziert. Anisöl, Fenchelöl, Geraniumöl, Pfefferminzöl, Rosmarinöl und Thymianöl wirkten zwar etwas schwächer als die beiden vorigen, haben aber den Keimungsprozeß noch immer ziemlich stark geschädigt. Knoblauchöl war beim Quellungsversuch weniger schädlich, dagegen äußerten die Dämpfe eine stärkere Giftwirkung. Auch das Terpentinöl hat beim Quellungsversuch die Keimlinge weniger beeinflußt als seine Dämpfe.

Die übrigen untersuchten ätherischen Öle, und zwar Bergamottöl, Cedernöl, Citronenöl, Eucalyptusöl, Rautenöl und Wacholderbeeröl haben beim Quellungsversuch die Versuchssamen nur relativ wenig benachteiligt.

Verbindungen, die als Bestandteile ätherischer Öle vorkommen.

Kohlenwasserstoffe. Die untersuchten Kohlenwasserstoffe: Cymol, Rechts- und Linkslimonen, Rechts- und Linkspinen und Styrol beeinflußten den Keimungsprozeß nur in geringem Maße.

Alkohole. Von den geprüften Alkoholen: Borneol, Linalool, Menthol, Terpineol und Terpinhydrat äußerte nur das Terpineol eine relativ stärkere Giftwirkung, die übrigen waren weniger schädlich.

Aldehyde. Von den untersuchten Aldehyden erwiesen sich Benzaldehyd, Citral und Zimtaldehyd als sehr heftige, nahezu tödliche Gifte für den Keimling; Anisaldehyd wirkte etwas weniger toxisch. Relativ am wenigsten haben Valeraldehyd und Vanillin die Keimung beeinflußt.

Ketone. Die stärkste Giftwirkung von den untersuchten Ketonen äußerte Carvon, dann folgten in abnehmender Reihenfolge: Campher, Fenchon und Eucalyptol (Cineol).

Phenole. Die untersuchten Phenole wirkten fast durchweg stark toxisch auf den Verlauf des Keimungsprozesses der Versuchssamen ein, dies gilt insbesondere vom Carvacrol, Thymol, Apiol und Safrol; nur Anethol übte eine schwächere Giftwirkung aus.

Säuren. Untersucht wurde nur die Anissäure, welche im Gegensatz zu dem für den Keimling sehr giftigen Anisaldehyd den Keimungsprozeß nur relativ wenig beeinflußte.

Ester. Der einzig untersuchte Salicylsäuremethylester erwies sich als ein ziemlich starkes Gift für die Versuchssamen.

Tabellen.

(W bedeutet Wurzel, S Stengel, Sp Spuren, v verkümmert.)
Die Messungsresultate sind in Millimetern ausgedrückt.

I. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 22. Februar bis 8. März.
Zimmertemperatur: 7 bis 16° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	29	—	84	—	63	—
2. Cedernöl . . .	28	—	69	—	50	—
3. Citronenöl . .	25	—	56	—	19	—
4. Fenchelöl . . .	0	—	45	—	11	—
5. Nelkenöl . . .	2	—	0	—	2	—
6. Pfefferminzöl .	0	—	0	—	0	—
7. Terpentinöl .	23	—	62	—	10	—
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	55	W 1—6, S 0	92	W Sp—6, S 0—2	83	—
2. Cedernöl . . .	50	1—6, 0	93	Sp—6, 0—2	70	—
3. Citronenöl . .	59	1—4, 0	86	Sp—4, 0—2	51	—
4. Fenchelöl . . .	30	Sp—3, 0	65	Sp—3, 0—1	17	—
5. Nelkenöl . . .	2	Sp, 0	0	— —	2	—
6. Pfefferminzöl .	13	Sp—2, 0	4	Sp—3, 0—1	5	—
7. Terpentinöl . .	53	1—6, 0	84	Sp—4, 0—2	21	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	72	W8—15, S Sp—2	93	W8—16, S6—14	85	—
2. Cedernöl . . .	84	2—14, 0—2	95	7—16, 5—12	81	—
3. Citronenöl . .	80	3—13, 0—2	92	6—15, 4— 9	71	—
4. Fenchelöl . . .	47	2—9, 0—1	73	4—10, 1— 5	19	—
5. Nelkenöl . . .	17	1—5, 0	0	— —	3	—
6. Pfefferminzöl .	71	1—7, 0—1	15	1—5, 0	21	—
7. Terpentinöl . .	87	5—15, Sp—2	91	7—15, 4—10	33	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	88	W15—25, S3—6	94	W18–33, S30–40	89	—
2. Cedernöl . . .	93	10—24, 2—6	96	18—33, 20–36	93	—
3. Citronenöl . .	90	10—21, 2—6	94	17–31, 20–35	79	—
4. Fenchelöl . . .	77	6—18, 1—5	77	14–19, 4–10	25	—
5. Nelkenöl . . .	35	3—10, 0—2	0	— —	3	—
6. Pfefferminzöl .	75	5—15, 1—4	41	7–19, 3–10	31	—
7. Terpentinöl . .	90	12—24, 3—6	93	18–32, 20–34	47	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W36—47, S6—13	94	S 50—74	91	S 15—30
2. Cedernöl . . .	94	32—46, 6—12	96	50—70	93	15—31
3. Citronenöl . .	93	30—45, 5—12	94	45—66	89	10—28
4. Fenchelöl . . .	79	15—30, 4—11	81	25—42	31	6—24
5. Nelkenöl . . .	45	3—12, 0— 5	0	—	4	0— 5
6. Pfefferminzöl .	90	10—33, 4— 6	50	20—36	43	6—20
7. Terpentinöl . .	90	36—45, 6—12	94	48—70	60	10—25
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	93	S 30—40	95	S 72—114	92	S 26—40
2. Cedernöl . . .	94	26—40	96	67—110	94	21—40
3. Citronenöl . .	93	25—40	94	66—103	92	17—37

I. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Raps
4. Fenchelöl . . .	91	S 10—30	83	S 50—75	41	S 8—34
5. Nelkenöl . . .	53	0—10	0	—	11	0— 8
6. Pfefferminzöl .	91	10—30	72	36— 70	51	8—30
7. Terpentinöl . .	93	25—40	95	68—110	76	18—38
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 45—60	95	S 100—150	93	S 35—53
2. Cedernöl . . .	95	40—67	95	90—130	94	33—55
3. Citronenöl . .	94	40—67	95	90—132	93	30—52
4. Fenchelöl . . .	92	26—55	87	65—108	51	20—45
5. Nelkenöl . . .	53	Sp—20	0	—	20	0—10
6. Pfefferminzöl .	91	25—53	78	55—100	57	22—48
7. Terpentinöl . .	94	45—68	95	93—142	81	30—46
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—105	—	S 130—160	—	S 50—70
2. Cedernöl . . .	—	75—103	—	124—155	—	46—70
3. Citronenöl . .	—	77—105	—	125—160	—	48—70
4. Fenchelöl . . .	—	70—100	—	85—120	—	38—60
5. Nelkenöl . . .	—	30— 60	—	—	—	8—40
6. Pfefferminzöl .	—	68—100	—	80—150	—	40—68
7. Terpentinöl . .	—	78—107	—	127—160	—	48—62

Das Wachstum der Wurzeln war bei Terpentinöl und Cedernöl dem normalen fast gleich, etwas schwächer war das Wurzelsystem bei Citronenöl entwickelt; eine wesentlich größere Schädigung der Wurzeln zeigten in zunehmender Reihenfolge: Fenchelöl, Pfefferminzöl und Nelkenöl.

II. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 8. bis 23. März.
Zimmertemperatur: 8 bis 16° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Raps
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	63	—	59	—	60	—
2. Anisöl	13	—	18	—	23	—
3. Bergamottöl .	32	—	30	—	21	—
4. Eucalyptusöl .	33	—	37	—	7	—
5. Kümmelöl . .	0	—	0	—	3	—
6. Rautenöl . . .	23	—	18	—	4	—
7. Rosmarinöl . .	12	—	2	—	4	—
Am 3. Versuchttage:						
1. Wasser	85	WSp—7, S0—Sp	91	WSp—8, S0—2	90	—
2. Anisöl	79	Sp—4, 0	72	Sp—3, 0—Sp	57	—
3. Bergamottöl .	80	Sp—5, 0—Sp	82	Sp—4, 0—Sp	62	—
4. Eucalyptusöl .	83	Sp—7, 0—Sp	85	Sp—6, 0—2	51	—
5. Kümmelöl . .	31	Sp—2, 0	0	— —	6	—
6. Rautenöl . . .	80	Sp—5, 0—Sp	68	Sp—4, 0—Sp	34	—
7. Rosmarinöl . .	76	Sp—4, 0	58	Sp 0	5	—

II. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W12—25,S 3—5	93	W14–26,S13–21	94	—
2. Anisöl	84	9—20, Sp—3	76	8–15, Sp– 3	81	—
3. Bergamottöl .	83	10—23, 2—5	90	10–20, 5–12	83	—
4. Eucalyptusöl .	86	11—24, 2—6	87	12–24, 8–17	80	—
5. Kümmelöl . .	74	2—10, 0—2	18	Sp– 1, 0–Sp	6	—
6. Rautenöl . . .	85	11—25, 2—5	75	9–20, 5–11	50	—
7. Rosmarinöl . .	78	9—20, 2—4	74	7–14, 2– 5	15	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W20—33,S8—13	93	S 28—40	94	S 10—20
2. Anisöl	86	14—30,Sp— 6	78	3—10	83	2—10
3. Bergamottöl .	85	15—30, 6—13	92	18—28	89	7—18
4. Eucalyptusöl .	90	15—33, 6—11	89	25—36	88	8—18
5. Kümmelöl . .	84	6—18,Sp— 6	46	0— 3	8	0— 4
6. Rautenöl . . .	88	17—30, 5—10	76	14—28	70	6—16
7. Rosmarinöl . .	85	15—27, 4— 9	79	7—15	19	4—12
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	93	S 25—36	93	S 60—83	94	S 25—45
2. Anisöl	88	8—22	78	12—38	83	14—30
3. Bergamottöl .	87	22—34	93	33—65	90	20—38
4. Eucalyptusöl .	91	20—33	90	55—80	90	20—36
5. Kümmelöl . .	84	7—20	61	4—20	9	4—10
6. Rautenöl . . .	89	11—27	77	30—64	75	20—39
7. Rosmarinöl . .	86	10—28	81	18—40	34	10—34
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—62	—	S 85—120	—	S 35—50
2. Anisöl	—	25—55	—	45— 72	—	25—48
3. Bergamottöl .	—	40—64	—	76—110	—	28—50
4. Eucalyptusöl .	—	38—63	—	80—116	—	29—50
5. Kümmelöl . .	—	20—50	—	27— 52	—	5—12
6. Rautenöl . . .	—	26—53	—	60—107	—	26—50
7. Rosmarinöl . .	—	27—60	—	42— 75	—	17—46
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 75—102	—	S 120—160	—	S 45—75
2. Anisöl	—	50— 90	—	85—112	—	38—70
3. Bergamottöl .	—	73—100	—	110—145	—	40—70
4. Eucalyptusöl .	—	70—105	—	115—160	—	40—70
5. Kümmelöl . .	—	50— 90	—	63— 95	—	v
6. Rautenöl . . .	—	53— 90	—	90—135	—	40—70
7. Rosmarinöl . .	—	55— 96	—	76—125	—	30—63

Das Wurzelsystem war am kräftigsten bei Eucalyptusöl entwickelt und dem Kontrollversuch nahezu gleich, schwächer bei Bergamottöl und Rautenöl, noch schwächer mit zunehmender Schädigung bei Anisöl, Rosmarinöl und Kümmelöl.

III. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 24. März bis 8. April.
Zimmertemperatur: 8 bis 16° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	62	—	88	—	59	—
2. Carvon	0	—	0	—	0	—
3. Citral	0	—	0	—	0	—
4. Cymol	65	—	66	—	31	—
5. Eucalyptol	52	—	63	—	16	—
6. d-Limonen	70	—	77	—	11	—
7. l-Limonen	59	—	74	—	6	—
8. d-Pinen	52	—	73	—	15	—
9. l-Pinen	57	—	86	—	18	—
10. Terpineol	0	—	0	—	0	—
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	80	W2—8, S0—Sp	93	W2—9, S0—3	80	—
2. Carvon	0	— —	0	— —	0	—
3. Citral	17	1—3, 0	0	— —	0	—
4. Cymol	83	2—7, 0—Sp	75	1—6, 0—2	43	—
5. Eucalyptol	87	2—8, 0—Sp	75	1—6, 0—2	27	—
6. d-Limonen	82	2—6, 0—Sp	83	1—6, 0—2	55	—
7. l-Limonen	82	2—8, 0—Sp	81	1—5, 0—1	11	—
8. d-Pinen	86	2—8, 0—Sp	76	1—6, 0—2	53	—
9. l-Pinen	68	2—6, 0—Sp	86	1—5, 0—2	26	—
10. Terpineol	33	1—3, 0	0	— —	2	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	89	W8—17, S2—4	95	W10—19, S4—9	90	—
2. Carvon	19	Sp— 2, 0	0	— —	0	—
3. Citral	41	Sp— 7, 0	0	— —	0	—
4. Cymol	91	7—16, 2—4	78	7—17, 3—6	50	—
5. Eucalyptol	89	5—16, 2—4	78	7—17, 3—6	42	—
6. d-Limonen	90	7—15, 2—3	90	8—17, 3—6	62	—
7. l-Limonen	90	7—15, 2—4	82	8—15, 3—5	27	—
8. d-Pinen	90	7—17, 2—4	83	7—18, 3—6	63	—
9. l-Pinen	78	5—13, 2—4	91	7—17, 3—6	38	—
10. Terpineol	80	1— 6, 0	11	Sp 0	22	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W15—27, S4—7	95	W14—28, S12—21	93	—
2. Carvon	34	1— 6, 0	0	— —	0	—
3. Citral	53	1—13, 0—3	0	— —	0	—
4. Cymol	91	14—26, 3—7	81	11—25, 7—15	72	—
5. Eucalyptol	89	13—27, 4—8	81	11—25, 7—16	58	—
6. d-Limonen	91	13—27, 4—7	92	12—26, 6—13	88	—
7. l-Limonen	92	13—25, 2—6	90	10—23, 7—13	47	—
8. d-Pinen	91	13—27, 4—7	88	11—27, 8—16	77	—
9. l-Pinen	82	10—22, 2—6	92	10—25, 7—15	64	—
10. Terpineol	90	1—14, 0—2	11	Sp— 5, 0— 1	24	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	93	W26—40, S12—25	95	S 37—58	94	S 15—30
2. Carvon	84	1—16, 0— 5	3	v	3	v
3. Citral	65	1—30, 0—10	0	—	0	—
4. Cymol	91	25—39, 11—28	83	30—47	83	13—27

III. Versuchsreihe (Fortsetzung.)

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Raps
5. Eucalyptol . .	90	W25–40,S12–27	83	S 30—54	77	S 10—30
6. d-Limonen . .	92	25–40, 11–22	92	26—43	90	10—25
7. l-Limonen . . .	91	24–39, 11–24	90	25—42	54	7—25
8. d-Pinen	91	24–40, 12–26	89	28—53	91	12—28
9. l-Pinen	82	20–37, 10–26	92	27—52	75	8—23
10. Terpineol . . .	90	2–30, 0– 9	30	0—10	31	0—11
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	93	S 26—50	95	S 68—95	94	S 26—48
2. Carvon	86	0—17	3	v	3	v
3. Citral	70	0—28	0	—	0	—
4. Cymol	92	29—55	83	60—90	86	25—46
5. Eucalyptol . .	90	27—50	83	60—90	83	23—45
6. d-Limonen . .	93	26—53	92	62—85	90	19—38
7. l-Limonen . . .	91	25—48	90	58—92	54	15—37
8. d-Pinen	91	27—56	89	64—92	91	18—43
9. l-Pinen	84	24—48	92	65—90	77	14—35
10. Terpineol . . .	90	10—30	34	14—33	39	10—26
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 42—70	—	S 80—125	—	S 32—60
2. Carvon	—	5—30	—	v	—	v
3. Citral	—	16—60	—	—	—	—
4. Cymol	—	41—70	—	77—125	—	30—60
5. Eucalyptol . .	—	40—70	—	76—123	—	27—56
6. d-Limonen . .	—	40—74	—	78—120	—	25—50
7. l-Limonen . . .	—	40—70	—	75—114	—	20—50
8. d-Pinen	—	41—78	—	80—120	—	25—55
9. l-Pinen	—	38—70	—	80—120	—	21—49
10. Terpineol . . .	—	20—40	—	34— 70	—	15—40
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 70—111	—	S 120—146	—	S 40—70
2. Carvon	—	v	—	v	—	v
3. Citral	—	30— 80	—	—	—	—
4. Cymol	—	70—116	—	112—146	—	40—70
5. Eucalyptol . .	—	70—110	—	117—145	—	38—66
6. d-Limonen . .	—	66—115	—	115—148	—	36—60
7. l-Limonen . . .	—	68—110	—	115—140	—	25—60
8. d-Pinen	—	74—118	—	123—150	—	34—68
9. l-Pinen	—	70—112	—	122—150	—	27—63
10. Terpineol . . .	—	49— 92	—	75—120	—	24—53

Am wenigsten beeinträchtigt wurde das Wurzelsystem bei Cymol und war dem Kontrollversuch nahezu gleich. Mehr oder weniger geschwächt waren die Wurzeln in zunehmender Weise bei Eucalyptol, d-Limonen, d-Pinen, l-Pinen und l-Limonen; am meisten geschädigt erschienen sie bei Terpineol, Citral und Carvon.

IV. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 10. bis 26. April.
Zimmertemperatur: 9 bis 16° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	77	W1—9, S0—Sp	89	W2—8, S0—2	70	—
2. Borneol	79	1—4, 0	70	1—4, 0—1	28	—
3. Campher, nat. .	73	1—5, 0	59	1—2, 0—Sp	13	—
4. Campher, synth.	78	1—6, 0—Sp	72	1—2, 0—Sp	16	—
5. Fenchon . . .	78	1—7, 0—Sp	69	1—3, 0—1	10	—
6. Linalool	70	1—5, 0	57	1—2, 0	11	—
7. Terpinhydrat .	80	1—8, 0—Sp	82	1—7, 0—2	70	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	86	W8—16, S Sp—3	91	W10—20, S4—8	75	—
2. Borneol	88	4—11, 0—2	84	2—10, 1—5	46	—
3. Campher, nat. .	87	5—11, 0—2	84	2—11, 1—4	25	—
4. Campher, synth.	86	6—12, Sp—2	76	2—12, 1—4	24	—
5. Fenchon . . .	88	6—14, Sp—2	73	5—10, 1—4	22	—
6. Linalool	80	5—11, 0—2	67	2— 8, Sp—3	45	—
7. Terpinhydrat .	92	6—16, Sp—3	90	8—17, 4—8	80	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W15—25, S2—7	93	W16—26, S9—17	86	—
2. Borneol	92	9—22, 1—5	85	10—20, 7—14	55	—
3. Campher, nat. .	89	10—22, 2—6	86	9—19, 5—11	27	—
4. Campher, synth.	90	10—21, 2—6	80	10—20, 5—10	25	—
5. Fenchon . . .	88	10—21, 2—6	75	9—18, 5—10	24	—
6. Linalool	87	8—17, Sp—3	69	6—16, 4— 8	53	—
7. Terpinhydrat .	93	12—24, 2—7	90	14—24, 8—17	87	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W20—32, S7—10	93	W23—35, S18—32	88	—
2. Borneol	92	15—28, 5— 9	85	17—30, 15—25	65	—
3. Campher, nat. .	89	15—28, 5— 9	86	15—25, 14—20	29	—
4. Campher, synth.	91	14—26, 5— 9	82	16—26, 13—20	25	—
5. Fenchon . . .	90	14—26, 5—10	79	17—27, 13—23	24	—
6. Linalool	88	13—23, 4— 8	71	14—23, 9—17	55	—
7. Terpinhydrat .	93	18—31, 7—10	90	20—34, 17—30	88	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W26-40, S10-17	93	S 35—50	89	—
2. Borneol	92	20-35, 7-13	85	30—42	67	—
3. Campher, nat.	89	21-37, 8-14	87	24—35	29	—
4. Campher, synth.	91	20-35, 7-14	86	23—34	25	—
5. Fenchon	91	20-35, 8-15	83	21—37	24	—
6. Linalool	90	18-33, 7-13	73	19—28	55	—
7. Terpinhydrat .	93	25-39, 10-17	91	34—50	90	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	91	S 16—25	93	S 42—66	89	S 15—30
2. Borneol	92	12—19	85	35—60	70	10—25
3. Campher, nat.	89	12—20	87	29—49	29	8—24
4. Campher, synth.	91	13—21	87	29—48	25	10—25
5. Fenchon	91	13—25	84	28—49	24	11—28
6. Linalool	90	10—24	74	23—38	55	10—24
7. Terpinhydrat .	93	16—25	91	40—65	90	13—30

IV. Versuchsreihe (Fortsetzung.)

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 23—39	—	S 55—80	—	S 21—40
2. Borneol	—	18—34	—	47—75	—	15—34
3. Campher, nat.	—	18—35	—	40—65	—	12—34
4. Campher, synth.	—	19—37	—	40—62	—	12—33
5. Fenchon	—	20—38	—	46—68	—	18—37
6. Linalool	—	17—35	—	35—58	—	15—30
7. Terpinhydrat .	—	22—38	—	53—78	—	20—38
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 48—76	—	S 90—120	—	S 35—55
2. Borneol	—	40—70	—	80—110	—	29—47
3. Campher, nat.	—	42—70	—	75—108	—	30—50
4. Campher, synth.	—	43—68	—	75—105	—	27—48
5. Fenchon	—	42—72	—	80—109	—	29—50
6. Linalool	—	36—71	—	70—100	—	28—48
7. Terpinhydrat .	—	45—73	—	80—115	—	32—52
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 63—90	—	S 115—150	—	S 45—68
2. Borneol	—	50—80	—	100—140	—	35—55
3. Campher, nat.	—	50—80	—	95—130	—	35—60
4. Campher, synth.	—	53—83	—	97—128	—	34—56
5. Fenchon	—	60—88	—	100—140	—	37—60
6. Linalool	—	55—85	—	90—125	—	37—57
7. Terpinhydrat .	—	60—89	—	108—150	—	39—59

Bei Terpinhydrat war das Wurzelsystem dem Kontrollversuch fast völlig gleich, bei den übrigen Versuchsobjekten dagegen wurde die Entwicklung der Wurzeln mehr oder weniger benachteiligt, und zwar in zunehmender Reihenfolge bei: Borneol, natürlichem Campher, Fenchon, synthetischem Campher und Linalool.

V. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 26. April bis 13. Mai.

Zimmertemperatur: 11 bis 16° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	80	W3—8, S 0—Sp	90	W4—10, S 1—3	67	—
2. Benzaldehyd .	9	1—3, 0	0	— —	6	—
3. Geraniumöl . .	25	1—5, 0	0	— —	5	—
4. Knoblauchöl .	87	1—7, 0—Sp	28	1— 3, 0—1	14	—
5. Lavendelöl . .	86	1—5, 0	61	Sp 0	26	—
6. Senföl	5	1—3, 0	0	— —	0	—
7. Thymianöl . .	66	1—4, 0	75	Sp— 3, 0—1	15	—
8. Wacholderbeeröl	88	2—6, 0—Sp	74	Sp— 5, 0—2	10	—
9. Salicylsäuremethylester .	11	1—2, 0	6	Sp 0	5	—

V. Versuchsreihe (Fortsetzung.)

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W15–25, S 4–8	94	W17–26,S13–18	88	—
2. Benzaldehyd .	33	2– 5, 0–2	8	Sp 0	22	—
3. Geraniumöl . .	89	3–11, Sp–3	12	Sp– 7, 0– 2	20	—
4. Knoblauchöl .	91	9–24, 2–7	52	8–19, 0–12	45	—
5. Lavendelöl . .	90	8–16, 2–5	75	7–17, 4–10	46	—
6. Senföl.	14	3– 9, 0–2	0	— —	0	—
7. Thymianöl . .	75	7–17, Sp–4	84	8–18, 4–11	33	—
8. Wacholderbeeröl	90	8–19, 1–5	78	9–23, 6–14	25	—
9. Salicylsäuremethylester .	76	2–11, 0–3	42	2–18, 0– 3	5	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W20–33,S 7–11	94	W23–36,S20–32	88	—
2. Benzaldehyd .	43	4–15, 0– 4	26	Sp–10, 0– 4	30	—
3. Geraniumöl . .	90	10–20, 2– 6	30	6–15, 2– 7	28	—
4. Knoblauchöl .	92	15–31, 4– 9	64	12–26, 14–28	49	—
5. Lavendelöl . .	91	14–25, 4– 8	79	10–23, 11–23	48	—
6. Senföl.	17	7–15,Sp– 5	0	— —	0	—
7. Thymianöl . .	84	14–24, 3– 7	85	11–24, 10–23	41	—
8. Wacholderbeeröl	91	15–28, 4– 9	79	13–31, 16–29	31	—
9. Salicylsäuremethylester .	78	6–20,Sp– 6	48	5–13, 2– 6	9	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W40–55,S12–20	94	S 47—68	88	S 14—26
2. Benzaldehyd .	76	9–30, 0–10	20	5—10	34	8—19
3. Geraniumöl . .	90	15–40, 5–15	40	10—25	29	10—23
4. Knoblauchöl .	92	28–50, 8–16	66	30—60	50	11—23
5. Lavendelöl . .	92	22–47, 7–15	80	29—50	50	10—21
6. Senföl	18	12–25, 4–10	0	—	0	—
7. Thymianöl . .	84	16–40, 5–15	86	30—53	43	11—20
8. Wacholderbeeröl	92	23–50, 9–16	82	38—65	39	10—18
9. Salicylsäuremethylester .	81	20–40, 5–14	50	15—30	14	6—19
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	92	S 20—40	94	S 70—105	88	S 18—35
2. Benzaldehyd .	77	0—20	20	13— 40	34	16—30
3. Geraniumöl . .	90	17—33	50	28— 64	29	17—33
4. Knoblauchöl .	92	19—38	66	50— 90	50	18—34
5. Lavendelöl . .	92	17—31	80	48— 80	50	17—33
6. Senföl.	18	9—19	0	—	0	—
7. Thymianöl . .	85	15—30	86	50— 90	44	17—30
8. Wacholderbeeröl	92	19—37	82	55—100	40	17—27
9. Salicylsäuremethylester .	81	16—30	50	36— 70	16	9—29

V. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 45—77	—	S 100—143	—	S 38—60
2. Benzaldehyd .	—	0—63	—	65— 95	—	23—42
3. Geraniumöl . .	—	40—70	—	77—135	—	35—60
4. Knoblauchöl .	—	45—80	—	90—148	—	36—60
5. Lavendelöl . .	—	40—68	—	87—136	—	30—57
6. Senföl.	—	28—55	—	—	—	—
7. Thymianöl . .	—	40—76	—	92—140	—	29—56
8. Wacholderbeeröl	—	42—78	—	96—150	—	28—52
9. Salicylsäuremethylester .	—	40—80	—	85—126	—	v
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 60—108	—	S 110—155	—	S 40—63
2. Benzaldehyd .	—	20— 83	—	90—120	—	26—50
3. Geraniumöl . .	—	53— 96	—	98—145	—	38—62
4. Knoblauchöl .	—	65—118	—	112—156	—	40—64
5. Lavendelöl . .	—	58— 98	—	105—146	—	33—60
6. Senföl	—	45— 75	—	0	—	0
7. Thymianöl . .	—	55—110	—	110—150	—	30—60
8. Wacholderbeeröl	—	56—110	—	115—156	—	30—58
9. Salicylsäuremethylester .	—	58—110	—	104—138	—	v

Das Wurzelsystem war bei Knoblauchöl und Lavendelöl dem Kontrollversuch fast gleich, schwächer entwickelt war es bei Thymianöl und Wacholderbeeröl, dann folgten mit zunehmender Schädigung: Geraniumöl, Salicylsäuremethylester, Benzaldehyd und Senföl.

VI. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 17. Mai bis 7. Juni.
Zimmertemperatur: 14 bis 18° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	78	W 1—7, S 0—Sp	88	W 2—8, S Sp—2	75	—
2. Anethol	60	1—4, 0	67	1—4, 0—1	44	—
3. Anisaldehyd .	46	1—3, 0	65	1—3, 0—1	6	—
4. Anissäure . . .	55	1—4, 0	11	Sp, 0	29	—
5. Menthol. . . .	75	1—4, 0	74	1—2, 0—1	27	—
6. Vanillin	47	1—3, 0	65	1—2, 0—1	14	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	88	W 10—22, S 2—6	92	W 14—28, S 9—15	89	—
2. Anethol	89	8—14, Sp—3	70	19—22, 5— 9	60	—
3. Anisaldehyd .	85	3—12, 0—3	81	7—15, 3— 8	24	—
4. Anissäure . . .	72	3—10, 0—3	73	3—15, 1— 8	57	—
5. Menthol. . . .	87	3—10, 0—3	86	6—14, 3— 8	37	—
6. Vanillin	73	3— 9, 0—3	79	6—14, 3— 8	41	—

VI. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W20–40, S10–18	92	W30–50, S30–48	90	S 12—20
2. Anethol	91	16–32, 5–10	74	22–42, 24–34	62	10—18
3. Anisaldehyd . .	88	10–30, 4–10	83	20–35, 20–32	38	7—13
4. Anissäure . . .	73	7–28, 4–10	77	10–35, 17–30	58	7—18
5. Menthol	90	9–29, 5–11	88	20–40, 20–34	51	10—19
6. Vanillin	76	9–29, 5–11	79	20–40, 21–35	55	8—15
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	92	S 25—45	92	S 67—120	91	S 27—40
2. Anethol	91	20—35	78	58— 88	65	25—38
3. Anisaldehyd .	89	20—35	83	65— 96	44	16—30
4. Anissäure . . .	85	20—33	77	60— 90	58	20—39
5. Menthol	90	23—39	88	64— 93	51	23—40
6. Vanillin	76	20—35	80	63— 90	53	20—35
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 50—76	—	S 100—150	—	S 40—52
2. Anethol	—	45—62	—	90—120	—	37—50
3. Anisaldehyd . .	—	47—70	—	100—140	—	30—50
4. Anissäure . . .	—	42—65	—	100—136	—	33—53
5. Menthol . . .	—	49—75	—	100—145	—	40—52
6. Vanillin	—	44—68	—	100—140	—	32—48
Am 16. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—110	—	S 120—166	—	S 50—60
2. Anethol	—	70—100	—	116—160	—	48—58
3. Anisaldehyd . .	—	75—110	—	120—163	—	45—60
4. Anissäure . . .	—	60—100	—	120—157	—	48—61
5. Menthol	—	80—112	—	120—160	—	50—63
6. Vanillin	—	72—105	—	120—158	—	40—57

Das Wachstum der Wurzeln war mehr oder weniger benachteiligt, und zwar in zunehmender Reihenfolge bei Anissäure, Anethol, Menthol, Vanillin und Anisaldehyd.

VII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 9. bis 28. Juni.
Zimmertemperatur: 15 bis 19° R.

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W 4—8, S 0—Sp	87	W 3—7, S Sp—2	78	—
2. Apiol	92	1—5, 0	49	Sp—2, 0—Sp	61	—
3. Carvacrol . . .	0	— —	0	— —	0	—
4. Safrol	70	1—2, 0	20	Sp 0	26	—
5. Styrol	91	1—4, 0	49	1—3, 0—1	24	—
6. Thymol	10	Sp, 0	0	— —	3	—
7. Valeraldehyd .	88	1—3, 0	81	Sp—2, 0—Sp	41	—
8. Zimtaldehyd .	0	— —	0	— —	0	—

VII. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Raps
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W8–15,SSp–5	93	W 10–20,S 6–10	88	—
2. Apiol	96	5–13, Sp–3	70	Sp– 3, Sp– 3	65	—
3. Carvacrol . . .	4	1– 3, 0	0	— —	0	—
4. Safrol	93	2– 7, 0–Sp	33	1– 5, 0– 1	33	—
5. Styrol	94	6–12, 2–4	56	5–15, 4– 8	36	—
6. Thymol	26	2– 5, 0	0	— —	6	—
7. Valeraldehyd .	93	6–11, Sp–3	89	8–18, 3– 6	61	—
8. Zimtaldehyd .	0	— —	0	— —	0	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W12—22,S5—10	94	W20–35,S15–23	90	S 5—10
2. Apiol	96	9—20, 2— 5	70	Sp– 4, 1– 4	72	2— 4
3. Carvacrol . . .	4	2— 4, 0	0	— —	2	v
4. Safrol	93	3—15,Sp— 3	35	3– 9, Sp– 2	35	2— 5
5. Styrol	95	9—20, 4— 9	58	16–30, 14–22	49	2— 6
6. Thymol	26	6—12, 0— 2	0	— —	8	2— 3
7. Valeraldehyd .	93	10—17, 3— 6	89	17–31, 11–18	67	3— 9
8. Zimtaldehyd .	2	1— 2, 0	0	— —	0	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W40–65,S18–28	94	W50–70,S50–60	90	S 16—18
2. Apiol	96	35–55, 9–15	72	v 5– 8	76	5—10
3. Carvacrol . . .	4	3–17, 0– 2	0	— —	5	0
4. Safrol	94	12–31, 8–12	55	3–15, 1– 6	35	5—12
5. Styrol	95	35–60, 14–25	59	40–65, 40–58	51	8—22
6. Thymol	28	18–31, 6–13	0	— —	8	5— 9
7. Valeraldehyd .	93	25–50, 12–22	89	40–60, 35–50	71	14—25
8. Zimtaldehyd .	2	v v	0	— —	0	—
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 38—52	—	S 92—112	—	S 28—40
2. Apiol	—	18—35	—	5— 20	—	9—10
3. Carvacrol . . .	—	v	—	—	—	v
4. Safrol	—	17—28	—	11— 20	—	16—30
5. Styrol	—	32—50	—	80—110	—	20—35
6. Thymol	—	20—31	—	—	—	v
7. Valeraldehyd .	—	35—40	—	60—104	—	25—40
8. Zimtaldehyd .	—	v	—	—	—	—
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 57—80	—	S 110—140	—	S 35—48
2. Apiol	—	30—50	—	10— 25	—	14—18
3. Carvacrol . . .	—	v	—	—	—	v
4. Safrol	—	28—48	—	20— 40	—	30—40
5. Styrol	—	55—80	—	100—140	—	30—47
6. Thymol	—	30—50	—	—	—	v
7. Valeraldehyd .	—	56—80	—	100—140	—	34—50
8. Zimtaldehyd .	—	v	—	—	—	—
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—108	—	S 140—170	—	S 40—60
2. Apiol	—	40— 65	—	10— 25	—	15—25
3. Carvacrol . . .	—	v	—	—	—	v
4. Safrol	—	50— 70	—	40— 65	—	40—60
5. Styrol	—	70—110	—	130—170	—	35—60

VII. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,2 g auf 100 ccm Wasser	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
6. Thymol	—	S 50— 70	—	—	—	S v
7. Valeraldehyd .	—	70—110	—	S 140—168	—	40—60
8. Zimtaldehyd .	—	v	—	—	—	—
Am 18. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 110—138	—	S 150—180	—	S 55—70
2. Apiol	—	50— 90	—	v	—	v
3. Carvacrol . . .	—	v	—	—	—	—
4. Safrol	—	60— 90	—	70—110	—	50—70
5. Styrol	—	95—140	—	140—175	—	55—70
6. Thymol	—	60—100	—	—	—	v
7. Valeraldehyd .	—	110—145	—	150—180	—	55—70
8. Zimtaldehyd .	—	v	—	—	—	—

Das Wurzelsystem entwickelte sich nur bei Styrol und Valeraldehyd nahezu normal, bei allen übrigen Versuchsobjekten dagegen war es stark geschädigt.

VIII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 29. April bis 15. Mai.
Zimmertemperatur: 11 bis 16° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 3 Tage.

0,05 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	87	W 2—7, S 0—Sp	88	W 3—8, S Sp—3	53	—
2. Benzaldehyd .	0	— —	0	— —	0	—
3. Salicylaldehyd	0	— —	0	— —	0	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W 7—15, S 2—4	90	W11–24, S5–10	59	—
2. Benzaldehyd .	20	Sp—2, 0	75	Sp– 5, 0– 2	7	—
3. Salicylaldehyd	16	Sp, 0	2	Sp, 0	0	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W19—33, S7—11	92	W22–36, S20–35	82	—
2. Benzaldehyd .	44	Sp— 8, 0—Sp	81	11–25, 9–18	9	—
3. Salicylaldehyd	16	Sp— 2, 0	13	3– 8, 1– 3	5	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W25—40, S9–16	92	S 34—50	82	S 9—20
2. Benzaldehyd .	46	1—9, 0– 2	83	14—30	9	v
3. Salicylaldehyd	16	1—7, 0–Sp	28	3— 8	5	v
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W38–60, S15–25	92	S 45—70	82	S 15—30
2. Benzaldehyd .	46	11–20, 7–15	84	30—47	9	v
3. Salicylaldehyd	16	7–13, 2– 6	30	4—20	5	v
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 30—57	—	S 83—108	—	S 22—45
2. Benzaldehyd .	—	20—38	—	43— 80	—	v
3. Salicylaldehyd	—	2—25	—	15— 50	—	v

VIII. Versuchsreihe (Fortsetzung).

0,05 g auf 8037 ccm Luftraum	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Raps
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—75	—	S 90—130	—	S 26—50
2. Benzaldehyd .	—	30—55	—	70—111	—	v
3. Salicylaldehyd	—	3—42	—	30— 70	—	v
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 60—112	—	S 110—154	—	S 38—60
2. Benzaldehyd .	—	36— 80	—	88—140	—	v
3. Salicylaldehyd	—	12— 75	—	50— 80	—	v
Am 16. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—150	—	S 130—175	—	S 42—70
2. Benzaldehyd .	—	65—100	—	100—164	—	v
3. Salicylaldehyd	—	55— 85	—	80—120	—	v

Die Wurzelbildung wurde sehr geschädigt, bei Salicylaldehyd relativ stärker als bei Benzaldehyd.

IX. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 7. bis 24. Juni.
Zimmertemperatur: 15 bis 19° R.

Einwirkungsdauer der Dämpfe: 8 Tage.

0,2 g auf 8037 ccm Luftraum	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W 6–14, S Sp–3	94	W 7—16, S 2—8	90	—
2. Knoblauchöl .	0	— —	0	— —	0	—
3. Senföl	0	— —	0	— —	0	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W24–38, S6–12	95	W23–38,S22–39	94	S 8—16
2. Knoblauchöl .	90	Sp– 4, 0	24	Sp, 0	10	0
3. Senföl	0	—	0	—	0	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	95	S 50—80	95	S 75—112	95	S 24—50
2. Knoblauchöl .	93	W Sp—4, 0—3	24	W Sp, 0	10	WSp–2,0
3. Senföl	0	—	0	—	0	—
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—110	—	S 100—160	—	S 30—55
2. Knoblauchöl. .	—	10— 40	—	30— 60	—	10—20
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 110—190	—	S 130—190	—	S 40—60
2. Knoblauchöl. .	—	25— 90	—	66—135	—	v
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—

Die Wurzeln aller Versuchsobjekte wurden durch die Dämpfe des Knoblauchöls sehr geschädigt, bei Senföl kam es überhaupt nicht zur Wurzelbildung.

X. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 8. bis 27. Juni.
Zimmertemperatur: 15 bis 19° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 3 Tage.

0,08 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W14—25, S3—6	93	W12—26, S6—11	77	—
2. Knoblauchöl. .	90	5—11, Sp—2	83	5—11, 1— 4	61	—
3. Senföl.	0	— —	0	— —	0	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	96	W20—30, S6—10	94	W20—32, S15—25	85	—
2. Knoblauchöl. .	91	8—20, 2— 6	84	12—20, 6—10	65	—
3. Senföl.	0	— —	0	— —	0	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	96	W30—45, S9—17	95	W30—46, S30—40	88	S 9—17
2. Knoblauchöl. .	94	10—27, 4—10	83	20—30, 15—20	70	5—10
3. Senföl.	0	— —	0	— —	0	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	96	W48—73, S28—40	95	S 60—90	89	S 20—30
2. Knoblauchöl. .	94	28—55, 15—25	89	50—60	73	17—28
3. Senföl.	0	— —	0	—	0	—
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	96	W60—85, S40—50	95	S 70—95	89	S 23—33
2. Knoblauchöl. .	94	40—65, 20—28	90	60—80	74	22—33
3. Senföl.	0	— —	0	—	0	—
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 50—70	—	S 100—125	—	S 30—43
2. Knoblauchöl. .	—	30—46	—	75—110	—	30—44
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—95	—	S 125—155	—	S 40—50
2. Knoblauchöl. .	—	56—80	—	100—150	—	40—52
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—120	—	S 140—170	—	S 50—60
2. Knoblauchöl. .	—	70—100	—	125—168	—	50—62
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—
Am 18. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 120—140	—	S 145—175	—	S 55—68
2. Knoblauchöl. .	—	80—115	—	135—175	—	55—70
3. Senföl.	—	—	—	—	—	—

Das Wurzelsystem war bei Knoblauchöl wesentlich schwächer entwickelt als beim Kontrollversuch, bei Senföl kam es überhaupt nicht zur Wurzelbildung.

XI. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 13. Mai bis 7. Juni.
Zimmertemperatur: 13 bis 18° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 7 Tage.

0,04 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	81	W1—7, S0—Sp	90	W1—7, S 0—3	55	—
2. Anethol	80	1—8, 0—Sp	89	1—7, 0—3	56	—
3. Anisaldehyd . .	77	1—6, 0—Sp	80	1—6, 0—3	57	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W7—15, S2—4	92	W7—17, S 4—8	73	—
2. Anethol	86	7—16, 2—4	90	8—19, 4—7	72	—
3. Anisaldehyd . .	83	4—12, Sp—4	86	6—16, 3—8	72	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W17—35, S6—12	93	W22—40, S18—35	87	—
2. Anethol	87	17—37, 6—11	91	23—41, 15—20	81	—
3. Anisaldehyd . .	86	14—31, 5—11	86	20—39, 17—35	81	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 20—30	94	S 60—80	87	S 18—30
2. Anethol	87	16—25	94	20—32	81	15—28
3. Anisaldehyd . .	86	20—32	87	58—80	81	19—30
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 35—46	94	S 95—120	87	S 27—40
2. Anethol	88	22—37	94	25— 37	82	23—37
3. Anisaldehyd . .	86	35—48	87	90—120	81	28—40
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 42—55	—	S 108—140	—	S 30—45
2. Anethol	—	25—40	—	30— 50	—	25—40
3. Anisaldehyd . .	—	42—56	—	108—138	—	31—46
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 50—70	—	S 120—150	—	S 33—50
2. Anethol	—	37—52	—	57— 80	—	30—46
3. Anisaldehyd . .	—	50—72	—	120—155	—	34—53
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 63—85	—	S 130—160	—	S 36—55
2. Anethol	—	48—70	—	68— 95	—	33—50
3. Anisaldehyd . .	—	63—86	—	130—160	—	36—56
Am 17. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 70—90	—	S 140—170	—	S 40—60
2. Anethol	—	60—80	—	70—100	—	36—54
3. Anisaldehyd .	—	70—94	—	140—165	—	40—60
Am 21. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—120	—	S 150—190	—	S 50—70
2. Anethol	—	90—116	—	80—130	—	40—60
3. Anisaldehyd .	—	100—130	—	150—186	—	50—70

Das Wurzelsystem war bei Anisaldehyd dem Kontrollversuch nahezu gleich, bei Anethol etwas schwächer entwickelt.

XII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 28. Mai bis 17. Juni.
Zimmertemperatur: 14 bis 19° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 7 Tage.

0,04 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	80	W 5—10, S 0—2	90	W 6—15, S 1—4	60	—
2. Safrol	81	3— 9, 0—1	76	3— 9, 0—2	35	—
3. Zimtaldehyd .	80	3—11, 0—1	85	5—14, 1—3	30	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	86	W 12—22, S 4—7	94	W 16—30, S 8—12	75	—
2. Safrol	84	7—19, Sp—3	76	6—12, 2— 6	45	—
3. Zimtaldehyd .	82	11—21, 3—6	88	15—29, 7—12	36	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W 30—50, S 16—23	95	S 35—52	88	S 12—20
2. Safrol	85	24—43, 8—12	79	7—12	60	5—11
3. Zimtaldehyd .	83	25—45, 11—19	90	29—50	61	10—20
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	91	S 35—52	95	S 80—110	90	S 20—42
2. Safrol	85	11—22	79	10— 16	62	10—15
3. Zimtaldehyd .	83	34—50	90	70—100	67	20—41
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 60—90	—	S 100—140	—	S 30—55
2. Safrol	—	17—30	—	13— 19	—	12—20
3. Zimtaldehyd .	—	55—70	—	90—130	—	30—52
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—100	—	S 130—170	—	S 38—60
2. Safrol	—	20— 35	—	20— 35	—	20—36
3. Zimtaldehyd .	—	75—110	—	120—164	—	40—62
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—135	—	S 140—185	—	S 45—65
2. Safrol	—	30— 46	—	25— 40	—	26—45
3. Zimtaldehyd .	—	95—145	—	135—175	—	45—70
Am 17. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 120—175	—	S 155—195	—	S 50—72
2. Safrol	—	40— 73	—	45— 65	—	27—48
3. Zimtaldehyd .	—	110—180	—	153—193	—	50—74

Safrol äußerte eine starke Giftwirkung auch auf die Entwicklung der Wurzeln, dagegen hat Zimtaldehyd das Wachstum der Wurzeln nur wenig beeinflußt.

XIII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 28. Mai bis 17. Juni.
Zimmertemperatur: 14 bis 19° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 7 Tage.

0,04 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	80	W 5—10, S 0—2	90	W 6—15, S 1—4	60	—
2. Carvacrol . . .	81	5— 9, 0—2	90	4—11, Sp—3	63	—
3. Thymol	80	5—11, 0—2	85	5—14, 1—4	50	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	86	W 12—22, S 4—7	94	W 16—30, S 8—12	75	—
2. Carvacrol . . .	85	10—20, 3—6	93	14—28, 7—12	69	—
3. Thymol	83	12—23, 4—7	90	15—29, 7—12	60	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W 30—50, S 16—23	95	S 35—52	88	S 12—20
2. Carvacrol . . .	88	24—45, 10—18	93	28—50	80	11—20
3. Thymol	85	30—50, 15—22	91	27—48	75	10—19
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	91	S 35—52	95	S 80—110	90	S 20—42
2. Carvacrol . . .	89	32—45	93	70— 95	90	20—42
3. Thymol	86	33—46	92	60— 90	80	20—40
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	91	S 60—90	95	S 100—140	91	S 30—55
2. Carvacrol . . .	89	56—70	93	90—125	83	28—55
3. Thymol	86	58—70	93	82—118	81	30—50
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 80—100	—	S 130—170	—	S 38—60
2, Carvacrol . . .	—	65— 85	—	120—160	—	36—60
3. Thymol	—	70— 92	—	110—145	—	33—56
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—135	—	S 140—185	—	S 45—65
2. Carvacrol . . .	—	86—120	—	130—170	—	43—63
3. Thymol	—	90—130	—	120—152	—	40—60
Am 17. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 120—175	—	S 155—195	—	S 50—72
2. Carvacrol . . .	—	100—165	—	150—177	—	48—70
3. Thymol	—	106—170	—	140—174	—	45—70

Die Entwicklung der Wurzeln blieb hinter der normalen zurück, die nachteilige Wirkung war bei Thymol wesentlich größer als bei Carvacrol.

XIV. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 23. September bis 15. Oktober.
Zimmertemperatur: 13 bis 15° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 6 Tage.

0,04 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W2—8, S0—2	82	W4—12, S1—4	75	—
2. d-Limonen . .	91	2—8, 0—2	83	4—12, 1—4	73	—
3. l-Limonen . . .	90	2—7, 0—2	79	3—10, 1—3	74	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 35—50	89	S 65—85	85	S 15—35
2. d-Limonen . .	94	22—40	90	40—65	76	12—32
3. l-Limonen . . .	93	20—38	88	30—50	77	11—31
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 75—112	—	S 100—140	—	S 32—50
2. d-Limonen . .	—	60— 90	—	90—120	—	28—47
3. l-Limonen . . .	—	40— 75	—	80—110	—	27—46
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 170—210	—	S 170—200	—	S 50—70
2. d-Limonen . .	—	140—175	—	140—170	—	45—66
3. l-Limonen . . .	—	130—165	—	110—150	—	44—64
Am 17. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 200—240	—	S 195—230	—	S 52—72
2. d-Limonen . .	—	180—230	—	165—200	—	48—68
3. l-Limonen . . .	—	160—220	—	140—195	—	46—67

Die Entwicklung der Wurzeln blieb gegen den Kontrollversuch zurück; das Wurzelsystem war bei l-Limonen etwas schwächer entwickelt als bei d-Limonen.

XV. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 8. bis 21. Mai.
Zimmertemperatur: 12 bis 17° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 6 Tage.

0,8 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W10—20, S2—5	90	W12–25, S10–20	93	—
2. d-Pinen	90	3— 6, 0—2	61	Sp 0— 1	81	—
3. l-Pinen	85	2— 6, 0—2	66	Sp 0— 1	80	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	95	W20–40, S10–20	95	S 50—80	94	S 16—30
2. d-Pinen	92	3– 9, Sp– 5	64	v	83	3— 7
3. l-Pinen	90	3– 8, 0– 5	66	v	81	3— 7
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 32—63	—	S 130—180	—	S 30—56
2. d-Pinen	—	2—18	—	v	—	3—17
3. l-Pinen	—	2—18	—	v	—	3—16

Auf die Entwicklung der Wurzeln äußerten sowohl d- als auch l-Pinen eine ungefähr gleich intensive Giftwirkung.

XVI. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 10. bis 24 April.
Zimmertemperatur: 9 bis 16° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 9 Tage.

0,04 g auf 8037 ccm Luftraum	Keim-prozente	Wicken	Keim-prozente	Weizen	Keim-prozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	75	W 3—10, S0—Sp	89	W 7—15, S 2—5	87	—
2. Campher, nat. .	77	Sp— 7, 0—Sp	83	Sp—10, 0—3	76	—
3. Borneol	85	Sp— 9, 0—Sp	90	Sp—11, 0—4	91	—
4. Campher, synth.	63	Sp— 3, 0	73	Sp, 0—2	63	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	87	W 10—18, S Sp—3	91	W 15—30, S 10—20	93	S 8—16
2. Campher, nat. .	89	5—14, Sp—3	89	5—15, 3—12	85	5—10
3. Borneol	91	6—14, Sp—3	92	5—15, 4—13	94	4—12
4. Campher, synth.	81	3— 7, 0—Sp	81	v, 0— 5	68	0— 6
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W 20—40, S 9—18	95	S 30—58	99	S 19—37
2. Campher, nat. .	94	14—25, 2—12	92	23—40	93	11—25
3. Borneol	94	12—23, 2—15	95	26—44	94	10—25
4. Campher, synth.	90	9—17, 2— 6	87	7—15	82	4—18
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 25—50	—	S 100—142	—	S 37—56
2. Campher, nat. .	—	18—38	—	60—104	—	23—48
3. Borneol	—	20—42	—	70—120	—	25—48
4. Campher, synth.	—	14—23	—	25— 53	—	15—35
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 35—52	—	S 100—160	—	S 30—60
2. Campher, nat. .	—	24—45	—	62—115	—	24—47
3. Borneol	—	27—50	—	80—138	—	26—50
4. Campher, synth.	—	15—27	—	36— 60	—	15—36
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 45—70	—	S 120—165	—	S 36—68
2. Campher, nat. .	—	30—60	—	86—136	—	25—48
3. Borneol	—	35—70	—	100—160	—	28—52
4. Campher, synth.	—	24—40	—	50— 75	—	20—48
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 55—86	—	S 130—180	—	S 45—80
2. Campher, nat. .	—	45—80	—	100—150	—	28—50
3. Borneol	—	50—88	—	115—180	—	32—55
4. Campher, synth.	—	30—52	—	70— 95	—	28—55

Die Wurzeln blieben in ihrer Entwicklung mehr oder weniger zurück, am wenigsten bei Borneol; eine größere Schädigung erlitten die Wurzeln beim natürlichen Campher, die größte aber beim synthetischen Campher. Die relativ geringe Giftwirkung der Borneoldämpfe ist jedoch zum Teil darauf zurückzuführen, daß von der angewandten Menge nur Spuren verdunstet sind, während von den anderen Substanzen die gesamte Menge in Dampf überging.

Über den Einfluß der Salze auf den Stoffwechsel.

1. Mitteilung:

Die Beeinflussung des respiratorischen Gaswechsels.

Von

Marcel Händel.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts und der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 1. Februar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Inhalt.

Zwischen den organischen Nahrungsstoffen und den mineralischen Bestandteilen der Nahrung besteht hinsichtlich der physiologischen Bedeutung ein fundamentaler Unterschied. „Die organischen Nahrungsstoffe dienen als Kraftquelle; es werden chemische Spannkräfte mit ihnen in unsere Gewebe eingeführt, welche bei ihrer Spaltung und Oxydation in alle diejenigen Formen der lebendigen Kraft sich umsetzen, welche das unseren Sinnen erkennbare Leben ausmachen" (*Bunge*). Die anorganischen Salze dagegen können als Energiespender keine Verwendung finden. Sie können nicht weiter oxydiert werden — es kann auch durch Spaltung keine Energie aus ihnen herausgeholt werden. In dieser Hinsicht bieten sie Berührungspunkte zu anderen wichtigen Bestandteilen der Nahrung — den Vitaminen; auf die Be-

ziehungen der Salze zu den Vitaminen werden wir später noch eingehender zu sprechen kommen. Die Salze haben ganz andere Aufgaben im lebenden Organismus zu erfüllen. Denn unentbehrlich sind sie sowohl für den wachsenden als für den fertigen Organismus. Dies hatte schon *Liebig* geglaubt und *Forster* hat es klipp und klar nachgewiesen. Wenn auch diese älteren Versuche durch die Entdeckung der Vitamine, die früher naturgemäß nicht berücksichtigt werden konnten, an Beweiskraft eingebüßt haben, das Hauptergebnis dieser Untersuchungen besteht auch heute noch zu Recht. An der Notwendigkeit der Salze zum Leben muß unbedingt festgehalten werden. Wenn wir die physiologische Bedeutung der Salze übersehen wollen, so müssen wir zwei Gruppen von Wirkungen unterscheiden. Zunächst werden die mineralischen Bestandteile der Nahrung als Bausteine verwendet, und zwar muß man hier zweierlei Dinge auseinander halten. Manche Mineralstoffe haben ganz speziellen Anforderungen zu genügen: Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der Knochen, Eisen des Blutes, Phosphor des Nervensystems, Jod der Schilddrüse. Außer diesen besonderen Leistungen sind Salze in allen lebendigen Zellen enthalten — man kann sie füglich zum Baumaterial der Zelle rechnen. Dies allgemeine Vorkommen der Salze innerhalb der Zellen führt aber schon zur zweiten Hauptgruppe von Wirkungen, die wir im Gegensatz zur ersten, der statischen, dynamische nennen wollen. Hier bilden die Salze nicht bloß Bestandteile des Zell- und Gewebsgefüges — hier greifen sie tief in den Mechanismus des Stoffwechsels hinein, indem sie auf die Beschaffenheit des Milieus, in dem sich die komplizierten Reaktionen, die den Stoffwechsel ausmachen, abwickeln, in vieler Hinsicht in bestimmender Weise einwirken. Während die statische Funktion der Mineralstoffe eine vorwiegend chemische ist, spielt die dynamische viel mehr in das physikalisch-chemische Gebiet hinüber. Viele Aufklärungen über den Mechanismus der dynamischen Salzwirkungen hat besonders die neuere Entwicklung der Kolloidchemie gebracht.

Uns interessiert hier vor allem diese zweite Gruppe von Salzwirkungen, und wir müssen zunächst auf einiges über die einzelnen Salze Bekanntes eingehen.

Zunächst das Kochsalz. Beim Menschen führte nach einem Versuch von *Belli* eine Beschränkung des Nahrungschlors von 6,0 auf 0,6 g Tagesmenge zu einer Abgabe von im ganzen 16,6 g N. In den ersten Tagen nach der Salzentziehung war der stärkste N-Verlust zu verzeichnen. Die negative N-Bilanz wurde sofort schwach positiv, als der Nahrung wieder 6,0 g Kochsalz zugesetzt wurden. Hand in Hand mit dem Mehrumsatz von N bei der Kochsalzentziehung geht eine Senkung des Körpergewichtes, die aber nur zum geringen Teile auf Eiweißeinschmelzung, in der Hauptsache auf Wasserverlust beruht. Dann steigt auch mit der durch verstärkte NaCl-Zufuhr sich einstellenden Wasserretention das Körpergewicht rasch wieder an.

Nur teilweise in Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen am Menschen stehen die Ergebnisse des Tierexperimentes. *Dubelir, Gabriel, Pugliese, Straub* und *Gruber* haben diese Frage eingehend studiert; *K. Frankenthal* hat ihre Angaben neuerdings bestätigt. Kleinere Kochsalzzulagen bedingen eine Einschränkung des Stickstoffumsatzes; nur nach großen Kochsalzgaben (0,6 bis 1,1 g pro Kilogramm), die zu einer gesteigerten Kochsalzausscheidung führten, kommt es zu einer Erhöhung des N-Umsatzes — und zwar wohl im Zusammenhang mit der gesteigerten Diurese. *Gruber* faßt das Ergebnis seiner Beobachtungen dahin zusammen, daß das NaCl ohne Einfluß auf die Intensität der Oxydationsprozesse, d. h. auf den Energiewechsel ist, daß es dagegen die N-Ausscheidung vermindert und daß bei längerer Dauer der Zufuhr dieser Einfluß auf die N-Ausfuhr sich sogar vermindert. Alles in allem scheinen die allerdings sich vielfach widersprechenden angeführten Beobachtungen zu zeigen, daß die Wirkung des NaCl auf den Eiweißumsatz in eminenter Weise abhängig ist von der Dosierung. Sehr kleine Kochsalzmengen, die mit der ungesalzenen Nahrung eingeführt werden, rufen eine Steigerung des N-Umsatzes und vermehrte N-Ausscheidung hervor; die mittleren Kochsalzmengen, wie sie der mundgerecht gesalzenen Nahrung beigegeben werden, wirken stickstoffsparend. Große NaCl-Mengen, die eine stärkere Diurese auslösen, können wiederum einen gesteigerten N-Umsatz erzeugen. Ein Einfluß des Kochsalzes auf den Gaswechsel wurde bis jetzt nicht nachgewiesen; auch über die Beeinflussung des Fett- und Kohlehydratstoffwechsels ist nichts Genaueres bekannt.

Die Rolle von Kalium und Calcium ist in der neueren Zeit ein Gegenstand regen Interesses geworden. Über die Wirkungen auf den Stoffwechsel wissen wir aber immer noch recht wenig. Wir wissen wohl, daß bei einigen Krankheiten — ich erinnere z. B. an die Beobachtungen von *Moraczewski* über den Kalkverlust des Körpers bei perniziöser Anämie — der Organismus tatsächlich an Kalk verarmt, aber wir sind noch durchaus im unklaren darüber, in welchem Umfange und in welcher Richtung eine solche Kalkverarmung auf den Stoffwechsel zurückwirkt. Auch die verstärkte Kalkzufuhr dürfte für den Umsatz der organischen Substanz nicht irrelevant sein. *Starkenstein* hat im exakten Stoffwechselversuch den Nachweis geführt, daß Kalkgaben beim Hunde die Allantoinausscheidung vermindern. *Miyadera* konnte im *Bickel*schen Laboratorium eine Verminderung der Harnsäureausscheidung beim Hunde durch Kalk erzielen. *Arnoldi* und *Ferber* fanden nach Injektionen sowohl von Ca- als Na- und K-Salzen eine bessere Ausnutzung des angebotenen Sauerstoffs und Verminderung der CO_2-Abgabe. Nach Untersuchungen von *Asada* kann das Kalium das ganze Salzgemisch hinsichtlich der steigernden Wirkung auf die Oxydation und Stickstoffretention ersetzen.

Die Wirkung von Alkalien auf den Stoffwechsel ist vielfach Gegenstand von experimentellen Untersuchungen gewesen. Die Alkalitherapie der Gicht und die Frage der alkalischen Mineralwasserkuren gab dazu die Veranlassung. *Kaplan* fand bei einem Gichtiker eine Verminderung der Harnsäureausscheidung nach Natriumbicarbonat. *Hirsch* und *Aufrecht, Mustafa Kemal, Bickel* und *Kemal* stellten eine Herabsetzung der Harnsäureausscheidung durch alkalische Wässer fest. Nach *Loewi* bewirken Alkalien eine Beförderung der Fettoxydation. *Rubner* und *Rost* fanden borsaure Salze besonders wirksam. Die Wirkung von Alkali auf den Gaswechsel wird durch *Loewy* und *Staehelin* und *Maase* verneint.

Im Eisen wurde von *Warburg* ein die Zellatmung mächtig anregender Katalysator gefunden. Über die dynamischen Wirkungen auf den Stoffwechsel bei Tier und Mensch ist sehr wenig bekannt. Bei jungen Tieren bewirkt Eisen Körpergewichtszunahme (*Abderhalden*). Es dürfte nicht bloß auf den blutbildenden Apparat, sondern auf den Stoffwechsel anderer Organe einwirken. Dafür spricht die Beobachtung von *Romberg*, daß der erhöhte Wassergehalt des Körpers bei Chlorose durch Eisenpräparate vermindert wird. So gut wie nichts wissen wir über die Wirkung der phosphorsauren Salze, die ja gegenüber dem organisch gebundenen Phosphor der Nahrung in den Hintergrund treten.

Es ist hier noch der wichtigen Arbeiten von *Zuntz*, *Mäder*, *Misch*, *Bing* zu gedenken, die den Anionen in den Mengen, wie sie bei Mineralwassertrinkkuren dem Körper zugeführt werden, eine Vermehrung des Sauerstoffverbrauches und eine Steigerung des respiratorischen Quotienten zuschreiben und die Kationen für unwirksam halten.

Von verschiedenen Autoren wurden Einwirkungen der Salze auf den Blutzucker festgestellt (*Arnoldi*, *Arnoldi* und *Roubitschek*, *Arnoldi* und *Ettinger*, *Paul Meyer*, *Lorant* u. a.). Auf diese Befunde wollen wir in der nächsten Mitteilung, die sich mit dem Einfluß der Salze auf Blutzucker und Leberglykogen beschäftigen soll, eingehen.

Wie wir aus der obigen Zusammenstellung, die auf Vollständigkeit keineswegs einen Anspruch erheben will, ersehen können, sind unsere Kenntnisse über die dynamischen Salzwirkungen noch recht lückenhaft und in vieler Hinsicht unsicher und wenig fest begründet. Eines erhellt zweifellos aus allen diesen Untersuchungen. Die Bedeutung der Salze für den Stoffwechsel der organischen Substanz ist groß, ihre Wirkung in mancher Hinsicht ausschlaggebend. Die Aufklärung des näheren Mechanismus der dynamischen Salzwirkungen liegt auf dem Gebiete der physikalischen Chemie.

Die Gesamtsumme der anabolischen und katabolischen Prozesse innerhalb der Zelle, mögen sie sich in der Form fermentativer Reaktionen oder in einer anderen Form abspielen, kann im ganzen oder in ihren einzelnen Teilen durch bestimmte Stoffe gefördert oder gehemmt werden — ähnlich den katalytischen Erscheinungen der anorganischen Chemie. Es kann so eine Beschleunigung oder Verlangsamung der Energieentladung in der Zelle erfolgen. Träger dieser katalytischen Wirkungen sind nun zweifellos im großen Umfange die Salze.

Nun gibt es Salze oder Ionen, für die die Zellmembran oder die äußere Grenzschicht der Zelle leichter, und andere, für die sie schwerer durchgängig ist. Davon kann es abhängen, ob einzelne Ionen in der perizellulären Flüssigkeit und im Blute, andere mehr im Zellinnern angetroffen werden. Aber auch unter den Ionen, die in das Zellinnere eintreten, trifft die Zelle vielleicht Auswahl, indem sie die einen festhält, möglicherweise bindet, während sie sich anderen gegenüber indifferent verhält. Und wenn hier im Innern der Zelle chemische Affi-

nitäten eine Rolle spielen sollten, dann könnten sie das wohl auch an der äußersten Grenzschicht der Zelle und hier auch an dem, was man „rezeptive Substanz" der Zelle nennt, nämlich der Anlagerungsstelle der Nervenendigungen an die Zelle.

In der Zelle herrschen jedenfalls die Kalium-, Magnesium-, Phosphationen und auch das Eisen vor, in den zirkulierenden Säften außerhalb der Zelle das Kochsalz und das Calcium. Man kann die erste Gruppe als „Zellsalze", die zweite als die Gruppe der „zirkulierenden Salze" bezeichnen. Indessen ist diese Unterscheidung nur mit einer gewissen Einschränkung zu machen. Das gilt vor allem für das Calcium. Gewiß ist es in der Zelle nur in sehr geringen Mengen vorhanden, aber es spielt trotzdem beim Ablauf des Zellgeschehens eine bedeutsame Rolle, besonders bei der Ionenladung der rezeptiven Substanz der Zellperipherie. Es tritt in antagonistische Beziehung zum Zellkalium, ist in seinem Einfluß auf die Zellfunktionen unter anderem wahrscheinlich Träger der Sympathicuswirkung, während die Parasympathicuswirkung auf die Zelle in einer Kaliumwirkung zu gipfeln scheint (*Zondek*).

Mag nun die Schranke, die wir zwischen Zellsalzen und zirkulierenden Salzen gezogen haben, bei einer genaueren Betrachtung der Dinge zum Teil wieder eingerissen werden, so sind wir dennoch berechtigt, einen solchen Unterschied zu machen, wenn wir den physiologischen Zustand und die an ihm erkannte Tatsache berücksichtigen, daß eben bei der Elementaranalyse von Geweben und Körperflüssigkeiten sich die genannten Differenzen hinsichtlich der Ionenverteilung ergeben.

In der vorliegenden Mitteilung will ich zunächst über Versuche berichten, die ich auf Veranlassung von Herrn Prof. *Bickel* anstellte, und die den respiratorischen Gaswechsel bei Ratten betreffen, wie derselbe durch Änderungen im Salzgehalt der Nahrung experimentell zu beeinflussen ist. In einer Versuchsreihe wurde zuerst die Wirkung studiert, die das Weglassen von Zellsalzen aus der Nahrung auf den Gaswechsel ausübt. Es wurden dabei Versuche mit kleinerer und größerer Kochsalzzulage ausgeführt. In weiteren Versuchsreihen wurden die Wirkungen der wichtigsten Zellsalze untersucht, und zwar das Calcium, Kalium, Phosphat und Eisen. Es wurde teilweise das betreffende Zellsalz den früher mehrere Wochen lang zellsalzarm ernährten Ratten gegeben, teilweise haben die Tiere von vornherein eine salzarme Ernährung, der Kochsalz und das untersuchte Zellsalz zugesetzt wurde, bekommen.

Methodik.

Zur Untersuchung des Gaswechsels haben wir uns eines jüngst beschriebenen Verfahrens, der Registriervorrichtung von *Arnoldi* bedient.

Das Verfahren wurde von *Arnoldi* und die Abbildungen von *Asada* in der Physiologischen Gesellschaft in Berlin im Juli 1923 demonstriert und ist in der Arbeit von *Asada* (diese Zeitschr. 148, 1923) beschrieben. Es basiert auf der *Haldane*schen Methode und eignet sich sehr gut für Untersuchungen an kleinen Tieren. Wir wollen hier nur ganz kurz das Prinzip des Verfahrens skizzieren: Die Apparatur besteht vor allem aus drei Wagen; die erste enthält das Aufnahmegefäß für das untersuchte Tier, die zweite das Gefäß mit konzentrierter Schwefelsäure für die Aufnahme des Wassers, die dritte das Natronkalkgefäß für die CO_2-Aufnahme und noch ein H_2SO_4-Gefäß. Während der Versuchsdauer — mehrere Stunden — wird durch das System ein Luftstrom durchgeleitet. Die Ausschläge der Wagen werden mittels eines Kymographions in Kurvenform registriert. Aus den Kurven wird dann die O_2-Aufnahme und die CO_2-Ausscheidung errechnet. Im übrigen sei auf die genannte Arbeit von *Asada* verwiesen.

Das Futter bestand aus Reis, Weizeneiweiß, Butter und Citronensaft. Diese Nahrungsmittel sind nach in unserem Laboratorium durchgeführten Analysen (*Asada*) recht zellsalzarm. Es wurde den Tieren nur destilliertes Wasser gereicht. Die Tiere wurden täglich gefüttert, die Nahrung wurde durch Kochen in Breiform gebracht. Auf eine Ratte kamen pro Tag ungefähr: 8 g Reis, 3 g Weizeneiweiß, 1 g Butter und 1 ccm Citronensaft. Die Nahrung enthielt genügende Vitaminmengen (Butter und Citronensaft, die erst nach dem Erkalten dem Brei zugesetzt wurden). Daß die Tiere die ihnen zukommenden Salzmengen auch tatsächlich fraßen, wurde genau kontrolliert.

Die Untersuchungen wurden an nüchternen, ungefähr 14 Stunden hungernden Tieren durchgeführt. Nach dem Hineinsetzen des Tieres in das Aufnahmegefäß des Apparates wurde so lange gewartet, bis das Tier eingeschlafen war, und dann erst mit dem Versuch begonnen. Das geschah gewöhnlich nach 10 bis 20 Minuten. Auf diese Weise wurde sicher der Grundumsatz festgestellt. Die Apparatur befand sich in einem besonderen, abgeschlossenen Raume von konstanter Temperatur — während der ganzen Versuchsdauer wurde der Raum abgesperrt.

Wirkung zellsalzarmer Ernährung.

Es wurden zwei Gruppen von Ratten fortlaufend untersucht. Die erste Gruppe (vier Ratten) bekam Kochsalz + Zellsalze. Die zweite Gruppe (sechs Ratten) bekam bloß das Kochsalz, und zwar drei Ratten mehr, drei weniger Kochsalz. Im einzelnen stellte sich die Versuchsanordnung folgendermaßen dar: Die Ratten Nr. 1 bis 4 bekamen täglich 0,3 g des folgenden Salzgemisches:

Kochsalz	100,0 g
Chlorkali	30,0 g
Calcium chloratum	40,0 g
Ferrum citricum	20,0 g
Magnesium citricum	20,0 g
Natrium phosphoricum	40,0 g

Die Ratten Nr. 5 bis 10 bekamen bloß Kochsalz, und zwar die Tiere Nr. 5 bis 7 pro Tag 0,1 g, die Tiere Nr. 8 bis 10 pro Tag 0,25 g — nachdem sie früher ungefähr eine Woche lang mit 0,3 g Salzgemisch pro Tag eingestellt worden waren.

Tabelle I.

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 1	1	105	0,324	0,362	R.-Q. = 0,814
	4	103	0,329	0,370	Die Tiere verzehren die gereichte Nahrung gern und rasch und sind lebhaft
	7	105	0,320	0,360	
	11	106	0,310	0,351	
	16	109	0,317	0,361	
	22	102	0,324	0,349	
	29	104	0,315	0,357	
	37	104	0,320	0,359	R.-Q. = 0,818
Ratte Nr. 2	2	113	0,381	0,420	R.-Q. = 0,803
	5	113	0,378	0,412	
	9	112	0,362	0,414	
	15	114	0,345	0,422	
	22	115	0,375	0,414	
	29	119	0,366	0,414	
	36	116	0,376	0,426	R.-Q. = 0,826
Ratte Nr. 3	1	98	0,328	0,368	R.-Q. = 0,818
	5	98	0,328	0,372	
	9	100	0,337	0,364	
	15	97	0,320	0,361	
	24	98	0,315	0,356	
	30	99	0,331	0,349	
	38	97	0,323	0,362	R.-Q. = 0,816
Ratte Nr. 4	1	120	0,382	0,421	
	4	123	0,365	0,419	
	10	120	0,359	0,428	
	16	118	0,372	0,420	
	25	116	0,388	0,332	
	33	119	0,374	0,320	
	38	120	0,365	0,321	
Ratte Nr. 5	1	105	0,356	0,395	R.-Q. = 0,809
	4	103	0,366	0,410	
	7	102	0,370	0,411	
	11	98	0,370	0,410	
	16	100	0,363	0,410	
	22	98	0,348	0,390	
	29	99	0,351	0,390	
	33	97	0,346	0,386	
	39	100	0,330	0,374	R.-Q. = 0,825
Ratte Nr. 6	2	126	0,356	0,390	R.-Q. = 0,799
	5	124	0,353	0,404	
	9	123	0,363	0,410	
	13	125	0,371	0,400	
	25	120	0,360	0,408	
	29	116	0,347	0,387	
	33	117	0,340	0,390	
	38	119	0,334	0,371	R.-Q. = 0,810
Ratte Nr. 7	1	98	0,301	0,338	R.-Q. = 0,819
	4	95	0,320	0,350	
	8	90	0,300	0,327	
	11	92	0,307	0,331	

Tabelle I. (Fortsetzung.)

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 7 (Fortsetzung)	17	91	0,290	0,323	
	22	89	0,282	0,325	
	29	88	0,291	0,322	
	37	88	0,282	0,320	
	45	89	0,262	0,305	R.-Q. = 0,848
Ratte Nr. 8	1	98	0,310	0,350	R.-Q. = 0,823
	9	96	0,319	0,355	
	8	94	0,320	0,356	
	11	93	0,310	0,347	
	16	93	0,300	0,340	
	22	94	0,311	0,340	
	28	93	0,280	0,322	
	34	92	0,292	0,320	
	39	91	0,281	0,318	R.-Q. = 0,825
Ratte Nr. 9	2	90	0,321	0,359	R.-Q. = 0,815
	5	90	0,326	0,365	
	9	87	0,310	0,355	
	13	86	0,293	0,338	
	19	85	0,309	0,345	
	25	87	0,305	0,344	
	30	84	0,300	0,339	
	36	82	0,289	0,331	R.-Q. = 0,835
Ratte Nr. 10	1	103	0,296	0,328	R.-Q. = 0,808
	9	101	0,303	0,330	
	8	105	0,310	0,339	
	12	103	0,300	0,330	
	17	100	0,290	0,327	
	27	99	0,281	0,316	
	33	96	0,268	0,300	R.-Q. = 0,816

Aus den Tabellen und Kurven ist folgendes zu ersehen: Das Körpergewicht und der Gaswechsel der Ratten Nr. 1 bis 4, denen das volle Salzgemisch gereicht wurde, zeigen nur geringfügigeSchwankungen ohne eine bestimmte Richtung. Die zellsalzfrei ernährten Ratten zeigen alle ein Absinken des Körpergewichtes und des Umsatzes. Dabei überwiegt in den meisten Fällen die Abnahme des Gaswechsels ziemlich beträchtlich die des Körpergewichtes. Es

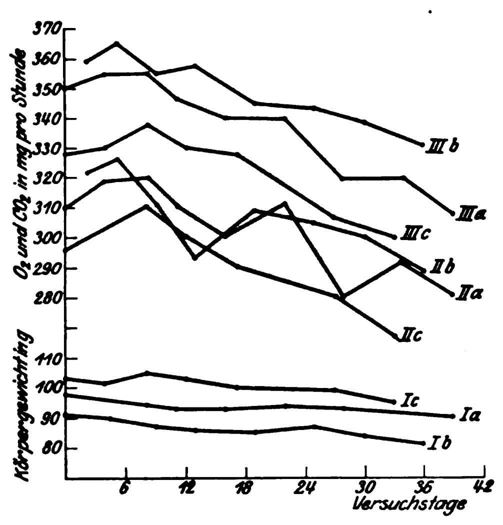


Abb. 1. I = Gewicht; II = O_2; III = CO_2; a = Ratte 8; b = Ratte 9; c = Ratte 10.

Tabelle II.

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 6	1	116	0,339	0,375	R. Q. = 0,808
	4	117	0,326	0,367	
	8	116	0,332	0,372	
	15	119	0,330	0,377	
	19	118	0,324	0,365	
	24	115	0,329	0,361	R.-Q. = 0,800
	26	tot	—	—	
Ratte Nr. 8	1	93	0,288	0,322	R.-Q. = 0,815
	4	92	0,279	0,320	
	7	92	0,275	0,315	
	11	91	0,272	0,316	
	15	91	0,278	0,320	
	21	91	0,282	0,325	
	28	91	0,287	0,320	
	37	90	0,276	0,310	R.-Q. = 0,819
Ratte Nr. 10	1	93	0,269	0,302	R.-Q. = 0,818
	5	92	0,258	0,300	
	9	91	0,264	0,302	
	15	90	0,258	0,290	R.-Q. = 0,820
	16	tot	—	—	
Ratte Nr. 11	1	90	0,343	0,385	R.-Q. = 0,818
	4	88	0,349	0,380	
	9	87	0,347	0,392	
	13	88	0,341	0,381	
	18	88	0,331	0,371	
	22	86	0,346	0,384	
	30	87	0,358	0,394	
	36	88	0,350	0,390	R.-Q. = 0,812
Ratte Nr. 12	1	120	0,346	0,381	R.-Q. = 0,803
	5	116	0,352	0,390	
	8	117	0,360	0,396	
	12	116	0,341	0,380	
	17	118	0,339	0,382	
	23	115	0,347	0,380	
	28	116	0,359	0,396	
	32	117	0,340	0,390	
	40	115	0,341	0,380	
	45	117	0,338	0,375	R.-Q. = 0,809
Ratte Nr. 13	1	105	0,333	0,376	R.-Q. = 0,823
	3	105	0,335	0,377	
	7	109	0,399	0,384	
	12	102	0,333	0,376	
	18	102	0,347	0,383	
	23	103	0,341	0,379	
	28	101	0,350	0,385	
	34	102	0,343	0,380	R.-Q. = 0,808

handelt sich also nicht nur um eine absolute, sondern auch um eine relative — auf die Gewichtseinheit zu beziehende Senkung des Umsatzes. Die Abnahme ist verschieden groß — sie beträgt etwa 5 bis

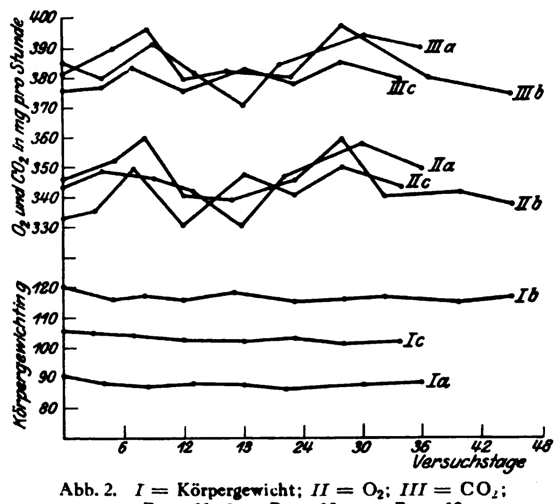


Abb. 2. I = Körpergewicht; II = O_2; III = CO_2; a = Ratte 11; b = Ratte 12; c = Ratte 13.

10 bis 15 Proz. innerhalb von etwa 5 Wochen. Dieser Abnahme des Umsatzes geht eine wenn auch unbeträchtliche, so doch ziemlich konstante Steigerung innerhalb der ersten bis zweiten Woche voraus.

Wirkung einzelner Salze.

a) Kalium.

Ratten Nr. 6, 8 und 10 der ersten Versuchsreihe bekommen, nachdem sie etwa 5 Wochen zellsalzarm ernährt worden waren, 0,15 g Kochsalz und 0,06 g Kaliumchlorid pro Tag und Ratte. Die Ratten Nr. 11, 12 und 13 bekommen zunächst etwa 5 Tage lang das volle Salzgemisch (0,3 g, s. oben), dann gleich 0,15 g Kochsalz und 0,06 g Chlorkali pro Tag und Ratte. Die Salze werden mit dem Reisbrei gut durchgemischt gereicht.

Die Ratten, die nach einer salzarmen Periode Kalium bekommen (Nr. 6, 8 und 10), verlieren noch in dieser Periode etwas an Körpergewicht; der Umsatz sinkt weiter ab. Das Tempo der Abnahme ist aber gegenüber der ersten Versuchsreihe verlangsamt — was man aus dem Vergleich der Tabellen leicht erkennen kann. Die Ratten Nr. 11 bis 13, die nach einer kurzen Einstellung mit vollem Salzgemisch dann bloß mit Kochsalz und Chlorkali ernährt werden, zeigen unbeträchtliche Gewichtsabnahmen. Der Umsatz sinkt kaum, im Gegenteil, er steigt bei den Ratten Nr. 11 und 13 eine Spur an.

b) Calcium.

Ratten Nr. 5, 7 und 9 der ersten Versuchsreihe bekommen 0,15 g Kochsalz und 0,1 g Calcium chloratum pro Tag und Ratte. Ratten Nr. 14, 15 und 16 bekommen nach fünftägiger Vorbereitung mit dem vollen Salz-

Tabelle III.

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 5	1	96	0,330	0,371	R.-Q. = 0,820
	5	97	0,330	0,365	
	10	95	0,321	0,358	
	15	97	0,315	0,356	
	20	94	0,316	0,352	
	25	92	0,310	0,350	
	31	90	0,311	0,350	
	40	86	0,308	0,340	R.-Q. = 0,805
Ratte Nr. 7	1	88	0,260	0,300	R.-Q. = 0.891
	4	86	0,266	0,306	
	9	84	0,258	0,293	
	14	85	0,248	0,287	
	19	81	0,248	0,270	R.-Q. = 0,793
	22	tot	—	—	
Ratte Nr. 9	1	84	0,284	0,327	R.-Q. = 0,831
	4	83	0,293	0,326	
	9	81	0,281	0,318	
	15	80	0,278	0,315	
	22	80	0,269	0,309	
	28	78	0,260	0,302	
	32	75	0,252	0,284	R.-Q. = 0,822
	33	tot	—	—	
Ratte Nr. 14	1	108	0,323	0,361	R.-Q. = 0,815
	5	106	0,326	0,363	
	8	103	0,334	0,370	
	12	102	0,318	0,359	
	18	101	0,308	0,345	
	24	100	0,306	0,346	
	32	100	0,300	0,340	
	40	97	0,287	0,329	R.-Q. = 0,835
Ratte Nr. 15	4	107	0,343	0,380	R.-Q. = 0,808
	9	106	0,345	0,384	
	13	105	0,355	0,390	
	16	105	0,364	0,398	
	22	103	0,340	0,383	
	30	104	0,321	0,365	
	35	100	0,320	0,341	R.-Q. = 0,802
Ratte Nr. 16	5	99	0,331	0,373	R.-Q. = 0,821
	9	98	0,330	0,368	
	12	94	0,336	0,375	
	17	95	0,320	0,361	
	23	93	0,322	0,364	
	28	93	0,316	0,358	
	33	92	0,301	0,344	
	38	88	0,289	0,324	R.-Q. = 0,817

gemisch (0,3 g) gleich 0,15 g Kochsalz + 0,1 g Calcium chloratum.

Sowohl das Körpergewicht wie der Gaswechsel sinken bei den zellsalzarm ernährten Ratten Nr. 5, 7 und 9 nach der Calciumzulage in raschem Tempo weiter ab. Es sei diesbezüglich besonders auf die Tabellen hingewiesen. Bei den Ratten Nr. 14 bis 16, denen 5 Tage das volle Salzgemisch und nachher bloß Kochsalz und Calciumchlorid gereicht wurde, beobachtet man Abnahme des Körpergewichtes und des Umsatzes. Die Abnahme des Gaswechsels schreitet etwas rascher fort als bei den zellsalzarm ernährten Ratten der ersten Versuchsreihe.

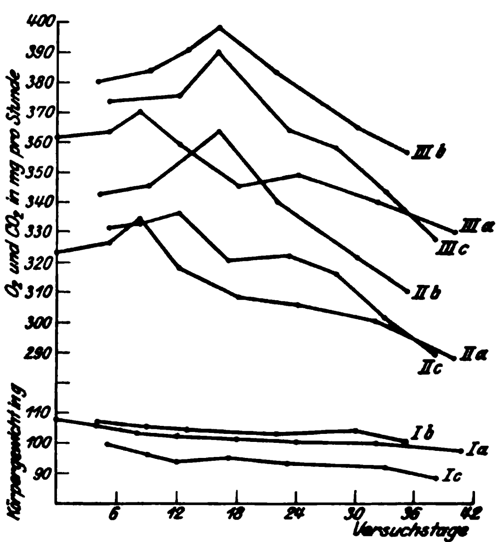


Abb. 3. *I* = Gewicht; *II* = O_2; *III* = CO_2; *a* = Ratte 14; *b* = Ratte 15; *c* = Ratte 16.

c) Phosphat.

Ratten Nr. 17, 18 und 19 bekommen zunächst 5 Tage lang das volle Salzgemisch (0,3 g), dann 0,15 g Kochsalz + 0,06 g Natrium phosphoricum pro Tag und Ratte.

Tabelle IV.

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 17	1	87	0,301	0,337	R.-Q. = 0,819
	4	85	0,310	0,343	
	9	89	0,314	0,350	
	15	82	0,303	0,340	
	21	82	0,298	0,338	
	28	80	0,291	0,328	
	36	79	0,281	0,322	R.-Q. = 0,835
Ratte Nr. 18	1	109	0,356	0,401	R.-Q. = 0,821
	3	108	0,360	0,402	
	7	105	0,366	0,404	
	11	105	0,350	0,390	
	18	103	0,338	0,381	
	28	104	0,330	0,368	
	34	100	0,328	0,359	R.-Q. = 0,798
Ratte Nr. 19	1	125	0,326	0,366	R.-Q. = 0,819
	4	123	0,329	0,362	
	9	120	0,339	0,370	
	15	118	0,330	0,368	
	21	117	0,320	0,361	
	28	118	0,312	0,353	
	33	116	0,310	0,352	
	41	115	0,306	0,338	R.-Q. = 0,806

Aus den Tabellen und Kurven ersieht man, daß durch Phosphatzulage kaum eine Änderung gegenüber der Zellsalzfreiheit eintritt. Das Körpergewicht und der Umsatz sinken ab, ganz ähnlich wie bei den Ratten Nr. 5 bis 10 während der ersten zellsalzarmen Periode.

d) Eisen.

Ratten Nr. 20, 21 und 22 bekommen 0,15 g Kochsalz + 0,02 g Ferrum citricum pro Tag und Ratte. Sie wurden 5 Tage auf das volle Salzgemisch eingestellt.

Tabelle V.

	Versuchstag	Körpergewicht g	O_2 g pro Std.	CO_2 g pro Std.	Bemerkung
Ratte Nr. 20	1	99	0,325	0,366	R.-Q. = 0,821
	4	98	0,325	0,362	
	9	96	0,338	0,375	
	19	94	0,330	0,372	
	20	92	0,325	0,366	
	26	93	0,328	0,364	
	32	94	0,318	0,353	
	37	95	0,306	0,343	R.-Q. = 0,806
Ratte Nr. 21	1	104	0,346	0,380	R.-Q. = 0,800
	4	105	0,348	0,384	
	8	101	0,360	0,395	
	12	103	0,349	0,392	
	20	100	0,336	0,378	
	26	98	0,330	0,371	
	33	98	0,315	0,350	R.-Q. = 0,810
Ratte Nr. 22	1	98	0,312	0,350	R.-Q. = 0,818
	5	98	0,320	0,358	
	9	95	0,330	0,368	
	14	96	0,316	0,353	
	20	94	0,312	0,348	
	25	94	0,302	0,338	
	31	92	0,290	0,330	
	38	93	0,289	0,322	R.-Q. = 0,811

Auch das Eisen zeigt — in der angewandten Versuchsanordnung — kaum einen Einfluß auf den Grundumsatz; die Abnahme wird durch Eisenzulage wenig beeinflußt. Das Körpergewicht scheint dagegen beim Vorhandensein von Eisen weniger rasch abzusinken als bei Zellsalzfreiheit.

Schlußbetrachtungen.

Ratten, die kalorisch genügende Nahrung und ausreichende Mengen von Kochsalz bekommen, verlieren trotzdem an Gewicht und zeigen Änderungen des Umsatzes, falls die Nahrung wenig Zellsalze enthält. *Der Umsatz steigt zunächst ziemlich rasch an, um dann langsam nach und nach abzufallen und nach einigen Wochen unternormal für das betreffende Tier*

zu werden. Bemerkenswert ist dabei erstens, daß die anfängliche Steigerung bei fallendem Körpergewicht auftritt, und zweitens, daß der weitere Abfall gleichzeitig mit dem weiteren Fallen des Körpergewichtes zustande kommt, die Gaswechselsenkung aber nicht der Gewichtsabnahme parallel verläuft. Der anfänglich gesteigerte Umsatz sinkt dann in einem solchen Tempo, daß nicht nur die anfängliche Steigerung wieder wettgemacht wird, sondern daß die Umsatzsenkung die stetig langsam fortschreitende Gewichtsabnahme in den meisten Fällen überflügelt. Mit anderen Worten sinkt der Umsatz, wie schon früher erwähnt, nicht nur entsprechend dem Verhalten des Körpergewichtes, sondern er fällt so ab, daß er am Schluß des Versuches auf die Einheit des Körpergewichtes bezogen im allgemeinen vermindert erscheint. Man stellt also hier dieselbe Erscheinung fest, die schon vom Hungerstoffwechsel und von der Avitaminose her bekannt ist.

Zuntz und *Lehmann* stellten an Cetti eine wenn auch nicht sehr beträchtliche Herabsetzung des O_2-Verbrauches und der CO_2-Produktion, bezogen auf die Einheit des Körpergewichtes, nach mehreren Tagen absoluten Hungers fest. Bei Unterernährung fanden *Magnus-Levy, Zuntz, Loewy* und *Zuntz* mittels Untersuchung des Gaswechsels eine Herabsetzung des Umsatzes. Bei der Avitaminose fanden zahlreiche Autoren (*Abderhalden, Tsuji* usw., Literatur s. bei *Asada*) eine allmählich fortschreitende Abnahme des Gaswechsels. Bemerkenswert scheint uns an den Versuchen von *Groebbels* die von ihm bei Avitaminose beobachtete anfängliche Steigerung des Umsatzes, die auch von uns bei der zellsalzarmen Ernährung beobachtet wurde. Ob diese anfängliche Steigerung sich auch bei einfacher Unterernährung nachweisen ließe, müßten noch genauere Untersuchungen lehren. Die Herabsetzung des Umsatzes des Körpers, der wahrscheinlich eine Herabsetzung des Zellumsatzes zugrunde liegt, bildet also ein verbindendes Glied zwischen den drei auch sonst Ähnlichkeiten aufweisenden Zuständen — dem allgemeinen Hunger, dem Vitaminhunger und dem Zellsalzhunger. Wir denken nicht daran, daraus eine Begründung für die Wesensgleichheit der drei Zustände abzuleiten, die bei aller Ähnlichkeit des Verschiedenen genug darbieten. Es läßt sich aber wohl denken, *daß die Zellen auf Schädlichkeiten — möge es der Mangel an Vitaminen, Zellsalzen oder Nahrungsstoffen überhaupt sein — mit einer Herabsetzung des Umsatzes reagieren. Man könnte in dieser Umsatzsenkung des Körpers und der Zellen eine zweckmäßige Maßnahme im Sinne der Nahrungsersparnis erblicken.* Offenbar ist der Körper nicht imstande, nur einzelne Gebiete des Stoffwechsels ausschließlich einzuschränken, und reagiert mit der Einschränkung des gesamten Umsatzes. Die anfängliche Steigerung ist vielleicht als Reizung der Zellen aufzufassen, vielleicht im Sinne einer anfänglichen Überkompensation. In unserem Falle spielen dabei vielleicht osmotische Unterschiede als auslösende Momente hinein. Doch konnten, wie aus den Tabellen ohne weiteres ersichtlich ist, beim Variieren der allerdings großen Kochsalzmengen *keine* wesentlichen Unterschiede beobachtet werden.

Ferner muß noch auf die *Kalium- und Calciumwirkung* eingegangen werden. Wie wir sehen konnten, besteht zwischen Kalium und Calcium bei längerer Fütterungszeit ein gewisser Antagonismus hinsichtlich der Wirkung auf den Umsatz. Wenn man Tieren, deren Körpergewicht und Gaswechsel durch eine Periode zellsalzarmer Ernährung eine Senkung erfahren hatten, jetzt Kaliumchlorid zur Nahrung zusetzt, so wird das weitere Abfallen, wenn nicht zum Stehen gebracht, so doch merklich retardiert. Man hat den Eindruck, als ob das Kalium die Tendenz hätte,

die übrigen Zellsalze gewissermaßen zu ersetzen. Viel schöner noch geht das hervor aus den Versuchen mit Kaliumfütterung, ohne daß eine zellsalzarme Periode eingeschoben wurde. Die Tiere scheinen dann eher eine Tendenz zur Erhöhung des Umsatzes zu zeigen. In dieser Hinsicht — überragende Bedeutung des Kaliums für den Gaswechsel innerhalb der Gruppe der Zellsalze — können wir die von *Asada* im *Bickel*schen Laboratorium erhobenen Befunde an Hunden vollinhaltlich bestätigen. Da unsere Tiere alle Kochsalz bekommen haben, so handelt es sich wohl um eine besondere Wirkung des Kaliums ganz allein und nicht um eine Wirkung der einwertigen Alkalien. Der Einfluß des Kalkes ist viel weniger auffallend. Nach einer zellsalzarmen Periode beschleunigt er das Tempo des Fallens des Körpergewichtes und des Umsatzes noch weiter. *Wenn man Ratten von vornherein ausschließlich mit $NaCl$ und $CaCl_2$ füttert, so kommt die Senkung des Körpergewichtes und des Umsatzes anscheinend rascher zustande, als bei vollkommener Zellsalzfreiheit.* Der Antagonismus von Kalium und Calcium ist also nicht auf den ersten Blick zu übersehen, er tritt aber bei näherer Betrachtung doch ziemlich deutlich zutage.

Die Auffindung der treibenden Kräfte, die Erklärung des Wirkungsmechanismus bei den beobachteten Erscheinungen ist nicht leicht. Wollten wir alle Eventualitäten erwägen, so würde das viel zu weit führen. Wie kompliziert das Problem ist, das ersieht man schon aus der Betrachtung unendlich einfacherer Objekte, wie es die einzelnen Zellen sind. *Warburg*, der umfangreiche Untersuchungen über die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen und ihre Beeinflußbarkeit anstellte, bemerkt über die Salzwirkungen: „Für Salze konnte irgend eine Regelmäßigkeit nicht entdeckt werden. Das ist ganz verschieden von Substanz zu Substanz, von Zelle zu Zelle". Aus einer Tabelle von *Warburg* ersieht man, daß bei roten Blutzellen mit verletzter Plasmahaut durch $CaCl_2$ die Oxydationsgeschwindigkeit stark herabgesetzt wird. Die Oxydationsgeschwindigkeit des befruchteten Seeigeleies bleibt in einer Lösung von $NaCl$, $CaCl_2$ und KCl bei entsprechender OH-Ionenkonzentration längere Zeit konstant. Reine Kochsalzlösung ist giftig. Für den Säugetierorganismus liegen die Verhältnisse naturgemäß noch viel komplizierter. Es sind da die Nahrungsresorption im Darmkanal, die Diurese, die Atmungsregulierung und nervöse Momente überhaupt ganz besonders in Betracht zu ziehen.

Es wäre denkbar, daß Kalium- und Calciumwirkung auf den Gaswechsel mit dem wechselnden Tonus im vegetativen Nervensystem zusammenhängt. Es wurde ja schon oben erwähnt, daß nach *Zondek* die Kaliumwirkung überall der Vaguswirkung, und die Calciumwirkung der Sympathicuswirkung entspricht. Es wäre immerhin möglich, daß die Anreicherung des Körpers mit dem betreffenden Ion, die nicht akut — wobei ganz unkontrollierbare Verhältnisse eintreten — sondern, wie wir es getan haben, durch chronische Darreichung erzielt wird, es wäre möglich, daß durch diese Anreicherung eine Umstimmung des Tonus im vegetativen Nervensystem erfolgt, derart, daß das Sympathicus-Parasympathicusgleichgewicht in einer bestimmten Richtung verschoben wird. Der Antagonismus von Kalium und Calcium hinsichtlich der Beeinflussung des Grundumsatzes liefe dann im wesentlichen auf den Vagus-Sympathicusantagonismus hinaus. Die Voraussetzung für diese Annahme wäre natürlich der sichere Nachweis, daß der Umsatz vom Vagus und Sympathicus im eindeutigen Sinne abhängig ist und daß man durch Reizung der betreffenden Teile des vegetativen Nervensystems immer nach einer Richtung ausschlaggebende Veränderungen

erzielt. Nun, dieser Nachweis steht noch aus. Bei der Untersuchung der autonomotropen Pharmaka (Adrenalin, Atropin) ist man — was den Umsatz anbelangt — zu vielfach widersprechenden und gar nicht einfach zu deutenden Resultaten gelangt. Auch andere Befunde zeigen, daß die Verhältnisse sich durchaus nicht in Schemen einzwängen lassen. Ein Beispiel: Der Calciumgehalt des Blutes ist bei Myxödem vermehrt, bei Basedow vermindert (*Leicher*). Dies stimmt mit der von uns bei der Fütterung festgestellten hemmenden Wirkung des Kalkes auf den Umsatz überein. Es läßt sich aber nicht vereinigen mit der verbreiteten Anschauung, daß bei den meisten Basedowfällen vermehrter Sympathicustonus besteht. Nun, die Blutwerte sind ja nicht in jeder Hinsicht maßgebend. Dies Beispiel zeigt aber — und es ließen sich mehrere anführen —, daß man mit der Identifizierung von Vagus- und Sympathicuswirkungen mit denen von Kalium und Calcium doch nicht alle Tatsachen in Einklang bringen kann. Die Verhältnisse beim lebenden Organismus sind eben komplizierter als die, die man bei Untersuchung isolierter Organe findet. Einen wichtigen Fingerzeig für die Wirkungsweise von Kalium und Calcium könnte die Feststellung von *Fr. Kraus* und *Zondek* abgeben. Sie fanden — wie auch schon oben erwähnt wurde — bei Herzversuchen, daß es unter Calciumwirkung an der Zelle zu einer lokalen Acidose, unter Kaliumwirkung zu einer lokalen Alkalose kommt. Diese Feststellung kann als Beispiel dienen, wie man sich die Kalium-Calciumwirkung auf den Zellumsatz vorzustellen hätte. Trotz der früher angeführten Angaben von *Warburg* über die Regellosigkeit der Salzwirkungen, muß man doch an der Annahme festhalten, daß der verursachte Umsatz jeder Zelle im Körper an ein bestimmtes Ionengleichgewicht in ihr und teilweise auch in der umspülenden Flüssigkeit gebunden ist. Ganz besonders wichtig scheint hier das Kalium-Calciumgleichgewicht zu sein. Der Befund von *Kraus* und *Zondek* zeigt nun, wie durch Störungen dieses Gleichgewichtes chemische Leistungen der Zelle geändert werden. Wir wollen annehmen, *daß durch Kalium bzw. Calciumanreicherung eine Störung im Ionengleichgewicht der Zellen und damit eine Umstimmung ihrer Leistungen nach einer oder der anderen Richtung hervorgerufen wird, die sich in der Änderung des Umsatzes kundgibt.* Es scheint, daß nicht sowohl die einzelnen Ionen für die Zellarbeit von Bedeutung sind, als der Synergismus einer bestimmten Ionenkombination. Wie dabei Veränderungen der Zellkolloide erfolgen, wie das vegetative Nervensystem mit im Spiele ist — dies kann erst nach einer genaueren Erforschung und tieferem Eindringen in die betreffende Materie entschieden werden.

Da durch Phosphat keine, durch Eisen nur ganz geringe Abweichungen des Umsatzes festgestellt werden konnten, wollen wir nicht weiter darauf eingehen. Vielleicht ließe sich durch Eisen eine stärkere Wirkung an jungen wachsenden Tieren erzielen, wie ja auch die Beeinflussung des Körpergewichtes, wie wir sie bei ausgewachsenen Ratten fanden, bei jungen Tieren viel besser zum Ausdruck kommt.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die Wirkung der zellsalzarmen Ernährung auf den Umsatz und die Wirkung der einzelnen Zellsalze untersucht. Die Salze wurden in der Nahrung mehrere Wochen lang gereicht und der

Gaswechsel in Abständen von einigen Tagen bestimmt. Die Versuche wurden an Ratten von etwa 100 g Gewicht ausgeführt.

2. Die zellsalzarm ernährten Ratten zeigen zunächst, in der ersten oder zweiten Woche eine Steigerung des Gaswechsels. Dann fällt der Gaswechsel langsam ab, um nach etwa 5 bis 6 Wochen konstant unter den anfänglichen Wert zu sinken. Die Umsatzsenkung ist im allgemeinen beträchtlicher als die Senkung des Körpergewichtes.

3. Bei zellsalzarm ernährten Ratten wird durch *Kalizulage zur Nahrung der Abfall des Gaswechsels und des Gewichtes verlangsamt.* Wenn von vornherein den Tieren nur NaCl + KCl gereicht wird, so fällt der Umsatz während der mehrwöchigen Beobachtungszeit nicht.

4. *Calciumzulage* nach einer zellsalzarmen Periode bewirkt weiteres *rasches Fallen des Umsatzes.* Bei Calciumfütterung von Anfang an findet sich nach etwa fünfwöchiger Beobachtung eine etwas stärkere Senkung als bei zellsalzarm ernährten Ratten.

5. Phosphat und Eisen ließen keine deutlichen Änderungen des Umsatzes erkennen.

Literatur.

Abderhalden, Zeitschr. f. Biol. **39**, 1900. — *Arnoldi*, Zeitschr. f. klin. Med. **94**, 1922. — *Arnoldi* und *Ferber*, ebendaselbst **97**, 1923. — *Arnoldi* und *Roubitschek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8; Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 22. — *Arnoldi* und *Ettinger*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 42. — *Asada*, diese Zeitschr. **140**, 1923. — *Bickel* und *Kemal*, Berl. klin. Wochenschr. 1920. — *Belli*, Zeitschr. f. Biol. **45**, 1904. — *Bunge*, zitiert nach *Albu Neuberg*, Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels. Berlin 1906. — *Dubelir*, zitiert nach *Albu* und *Neuberg*. — *Forster*, zitiert nach *Albu* und *Neuberg*. — *K. Frankenthal*, Zeitschr. f. physikal. u. diät. Therapie **29**, 1920. — *Gabriel*, zitiert nach *Albu* und *Neuberg*. — *Groebbels*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **122**, 1922; Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 13. — *Gruber*, Verhandl. d. 71. Naturforscherversammlung in München 1899. — *Hirsch* und *Aufrecht*, Zeitschr. f. physikal. u. diät. Therapie 1905. — *Höber*, Verhandl. f. Ges. d. Naturforsch. u. Ärzte, 87. Vers., 1922 (Verlag Vogel, 1923). — *Kaplan*, Veröffentl. d. Zentralstelle f. Balneologie **1**, H. 8. — *Kemal*, Zeitschr. f. physikal. u. diät. Therapie. 1920. — *Fr. Kraus* und *S. G. Zondek*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 36, S. 1773. — *J. Loeb*, Die Naturwissenschaften, H. 12, 1923. — *Leicher*, Deutsch. Kongr. f. inn. Med. Wiesbaden 1922. — *Loewy* und *Zuntz*, Berl. klin. Wochenschr. 1916; diese Zeitschr. **90**, 1918. — *Loewy*, Pflügers Arch. **43**, 1888. — *Liebig*, zitiert nach *Albu* und *Neuberg*. — *Lorant*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 43. — *Magnus-Levy*, Zeitschr. f. klin. Med. **60**, 1906. — *P. Mayer*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 25. — *Miyadera*, Zeitschr. f. physikal. u. diät. Therapie 1921. — *Moraczewski*, Zeitschr. f. klin. Med. **33**, 1897; Virchows Arch. **159**, 1900. — *W. Pauli*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 1. — *Pugliese*, zitiert nach *Albu* und *Neuberg*. — *Romberg*, Berl. klin. Wochenschr. 1897. — *Rubner* und *Rost*, Arbeiten d. Kaiserl. Gesundheitsamtes Berlin **19**, 1902. —

Spiro, Verhandl. d. Ges. d. Naturf. u. Ärzte, 87. Vers., 1922. — *Stachelin* und *Maase*, Veröffentl. d. Zentralstelle f. Balneologie **2**. — *Starkenstein*, diese Zeitschr. **106**. — *Straub*, Zeitschr. f. Biol. **37**, 38, 1899. — *Tsuji*, diese Zeitschr. **129**, 1922. — *Warburg*, Ergebn. d. Physiol. 1914. — *S. G. Zondek*, diese Zeitschr. **132**, 1922; Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 9. — *Zuntz*, diese Zeitschr. **55**, 1913. — *Zuntz* und *Lehmann*, Berl. klin. Wochenschr. 1887; Virchows Arch. **131**, Suppl. **1**, 1893. — *Zuntz*, *Mäder*, *Misch*, *Bing*, Zeitschr. f. Balneologie 1913, Nr. 12 und 13. — *Zuntz* und *Mäder*, Veröffentl. d. Zentralstelle f. Balneologie **2**, 39, 1914.

Über den Einfluß der Salze auf den Stoffwechsel.

II. Mitteilung:

Blutzucker und Leberglykogen.

Von

Marcel Händel.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 15. Februar 1924.)

Die Beeinflussung des Diabetes mellitus durch Mineralwasserkuren mittels glaubersalzhaltiger Quellen ließ vermuten, daß die Mineralstoffe für den Kohlehydratstoffwechsel nicht ohne Bedeutung sind. Diesen empirischen Beobachtungen folgten erst relativ spät genauere Untersuchungen über den Einfluß der Elektrolyte auf den normalen und pathologisch veränderten Kohlehydratstoffwechsel. Neuerdings beginnt man auch hier, wie auf vielen anderen Gebieten, den Ionen eine sehr große Bedeutung beizumessen.

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigte sich mit der Salzglykosurie und mit der Wirkung intravenöser Zufuhr verschiedener Salze auf den Blutzuckerspiegel. Der Mechanismus des Zustandekommens der Salzglykosurie ist noch nicht vollkommen aufgeklärt.

Fischer stellte fest, daß man bei Kaninchen durch Kochsalzinjektion in die Ohrvene Glykosurie hervorrufen kann, die bei Calciumzusatz unterbleibt. *Mc. Guigan* fand, daß bei Kaninchen die Salzglykosurie nach Nebennierenexstirpation ausbleibt, bei Hunden und Katzen nicht. Der Kaninchenversuch schien darauf hinzudeuten, daß die Salzglykosurie durch eine durch den Sympathicusreiz vermittelte Adrenalinausschüttung zustande kommt. Die Versuche an Hunden und Katzen deutet der Autor im Sinne einer Salzwirkung auf die Bindungsfähigkeit der Gewebe für Zucker. Für die zentrale Genese der Salzglykosurie sprechen die Versuche von *Wilenko*, der bei Kaninchen das Ausbleiben der durch intravenöse Kochsalzinjektion bewirkten Hyperglykämie nach Splanchnicotomie beobachtete; Zusatz von $KCl + CaCl_2$ verhinderte gleichfalls das Auftreten der Kochsalzhyperglykämie. *Naito* beobachtete ebenfalls, daß die durch Kochsalzinfusion bewirkte Glykosurie bei splanchnicotomierten Tieren unterbleibt. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen läßt sich nicht mit Sicherheit

entscheiden, ob die Kochsalzglykosurie beim Tier durch einen Reiz auf das zentrale Nervensystem, durch die Änderung des Bindungsvermögens der Gewebe oder der Durchlässigkeit der Niere für Zucker erfolgt. Beim Menschen konnte *Schenk* nach Infusion einer 10proz. Kochsalzlösung bloß eine der Autotransfusion aus den Geweben entsprechende Herabsetzung des Blutzuckerspiegels erreichen. Auch Calciumchlorid setzte den Blutzuckerspiegel entsprechend der Salzmenge vorübergehend herab. *Hochfeld* untersuchte neuerdings die Wirkung von Calcium und Kalium auf den Blutzuckerspiegel bei intravenöser Einverleibung und fand nur ganz geringfügige Veränderungen. Die Zuckerausscheidung beim Phlorrhizindiabetes des Hundes und des Menschen wird durch Calciuminjektionen herabgesetzt (*Belak*, *Jakoby* und *Rosenfeld*), wie ja auch die Wirkung der Calciumsalze auf die Diurese mehrfach nachgewiesen wurde (*Chiari* und *Januschke*, *Eisner*, *Hamburger* und *Brinkmann*). Hierher gehören schließlich die Untersuchungen von *Elias* und *Weiss* über die Beeinflussung der Hyperglykämie durch Injektionen von Mono- und Dinatriumphosphat.

Die zweite Gruppe von Arbeiten beschäftigt sich mit der Wirkung der peroralen Salzzufuhr auf den Zuckerstoffwechsel. Diese Versuche wurden meistens mit Mineralwässern angestellt. die größte Beachtung hat man dem Karlsbader Wasser geschenkt. *P. Mayer* untersuchte im *Neuberg*schen Institut zunächst den Einfluß des Karlsbader Wassers und Salzes auf die alkoholische Gärung; dann stellte er Versuche über die Beeinflussung des Blutzuckers bei Kaninchen an. Die Tiere wurden mehrere Wochen lang mit Hafer ernährt und mit Karlsbader Mühlbrunnen getränkt. Nach genügend langer Zufuhr wurde der Blutzucker auffallend niedrig (z. B. von 0,095 auf 0,05 Proz. nach 4 Wochen). Es gelang nicht mehr, bei diesen Tieren alimentäre Hyperglykämie hervorzurufen. *P. Mayer* hält das Sinken des Blutzuckers und das Ausbleiben der alimentären Hyperglykämie nach Zufuhr großer Dosen Karlsbader Wassers für eine Phosphatwirkung, ohne über den Wirkungsmechanismus etwas Genaueres aussagen zu können. *Arnoldi* und *Roubitschek* fanden, daß der Blutzucker bei Stoffwechselgesunden sich nach Einnahme von Karlsbader Wasser in den nächsten Minuten und Stunden verschieden verhält. Bei Zuckerkranken sinkt der Blutzucker nach Karlsbader Wasser erheblich ab. Ferner untersuchten *Arnoldi* und *Roubitschek* die Alkalireserve nach *van Slyke* und konnten bei Zuckerkranken mit verminderter Alkalireserve eine Vermehrung nach einer Trinkkur mit Mühlbrunn feststellen. Es handelt sich hier nicht um einen einfachen quantitativen Effekt mit Einführung größerer Mengen Alkali. *Arnoldi* und *Ettinger* untersuchten außer Karlsbader Salz noch Na_2SO_4, Na citr. und Na bicarb. bezüglich ihrer Wirkung auf den Blutzucker und alveolare Kohlensäurespannung. Ein erhöhter Blutzuckerspiegel sank fast ausnahmslos, ein besonders niedriger Anfangswert des Blutzuckers stieg nicht selten an. Im Blute kommt es zu einer vorübergehenden relativen Acidosis. *Arnoldi* schreibt der Störung des Mineralstoffwechsels eine ausschlaggebende Rolle beim Zustandekommen der diabetischen Stoffwechselstörung zu. Es handelt sich nach seiner Theorie beim Diabetes um eine primäre Störung des Elektrolytgleichgewichtes im Organismus, die die kolloidale Struktur der Zellgrenzflächen so verändert, daß Zucker im verminderten Maße an die Stellen seiner Verbrennung gelangen kann. Durch die Mineralwasserkur soll der Stofftransport im Körper gefördert und in normale Bahnen gelenkt werden. *Lorant* prüfte den Einfluß von Na-, K-, Ca-Salzen in Form von Chloriden, Sulfaten, Phosphaten, Carbonaten,

Jodiden auf die Zuckerausscheidung bei Diabetikern und kam zu folgenden Resultaten: Die Einwirkung der Salze setzt sich zusammen aus dem Einfluß sowohl der Anionen wie der Kationen, die sich gegenseitig verstärken oder abschwächen können. Die Wirkung ist in hohem Maße abhängig von der Dosierung. Bei kleinen Dosen findet sich meistens eine Erniedrigung, bei hohen Dosen eine Erhöhung der Glykosurie.

Aus allen diesen Untersuchungen, die als bedeutsame Ansätze zu einer späteren genaueren Erforschung der Rolle der Ionen für den Umsatz der Kohlehydrate im Organismus betrachtet werden müssen, ist insbesondere zu ersehen, daß durch Störungen des Ionengleichgewichtes Änderungen des Blutzuckerspiegels und der Zuckerausscheidung hervorgerufen werden können. Wir wollen in der vorliegenden Mitteilung über Versuche berichten, die wir in der weiteren Verfolgung der dynamischen Stoffwechselwirkungen der Salze, und zwar insbesondere der Zellsalze, angestellt haben, und die sich mit den Störungen des Kohlehydratstoffwechsels unter dem Einfluß der alimentär bedingten Änderungen des Elektrolytgleichgewichtes befaßten.

Die Versuche wurden an Ratten von etwa 90 bis 110 g Körpergewicht ausgeführt. In der ersten Versuchsreihe haben wir die Wirkung zellsalzarmer Ernährung auf den Blutzucker- und den Glykogengehalt der Leber studiert. Die Ratten wurden bei einer bestimmten kalorisch und, was den Vitamingehalt betrifft, ausreichenden Ernährung gehalten. Die Kontrollratten bekamen das volle Salzgemisch, das Kochsalz, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumphosphat und Eisencitrat enthielt, die Versuchsratten bekamen bloß Kochsalz. Die Kochsalzdosierung war so gewählt, daß die mit dem Salzgemisch gefütterten Ratten alle in diesem die gleiche Menge NaCl bekamen, daß die zellsalzfrei ernährten Ratten zum Teil dieselbe Menge NaCl erhielten, die die Zellsalztiere im Rahmen des Zellsalz-Kochsalzgemisches erhielten, zum Teil aber auch mit einer etwas größeren Kochsalzmenge gefüttert wurden, die dem Gewicht nach nur wenig geringer war als die gesamte Salzmenge der Zellsalztiere. Die Versuchsresultate wurden durch die divergierenden Kochsalzgaben nicht beeinflußt. Einzelheiten bezüglich der genaueren Zusammensetzung der Nahrung und des Salzgemisches finden sich im experimentellen Teil. Nach 4 bis 7 Wochen wurden die Tiere durch Entblutung aus der Karotis getötet und der Blutzucker- und der Glykogengehalt der Leber bestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Wirkung einzelner Salze untersucht, und zwar die von Kaliumchlorid, Calciumchlorid und Natriumphosphat. Es wurde auf diese Weise vorgegangen, daß den Tieren die gewöhnliche Kost, Kochsalz und das betreffende Salz gereicht wurde. Die Versuchsdauer war etwa 6 bis 7 Wochen. Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auch hier auf den experimentellen Teil verwiesen.

Was zunächst die zellsalzarme Ernährung betrifft, so konnte folgendes festgestellt werden: *Die zellsalzarm ernährten Ratten zeigen im Durchschnitt im Vergleich zu den mit vollem Salzgemisch ernährten Tieren eine nicht sehr beträchtliche Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Der Glykogengehalt der Leber ist bei den meisten zellsalzarm ernährten Tieren etwas unter der Norm der Kontrolltiere.* Um diese Befunde besser verstehen zu können, wollen wir auf die beiden mit dem Zellsalzhunger verwandten Zustände des „echten" Hungers und der Avitaminose eingehen.

Der Glykogenschwund beim Hunger ist schon lange bekannt. Der Blutzucker ist im Hungerzustande bald mehr, bald weniger vermehrt (Literatur siehe bei *Collazo*). Bei der Avitaminose wurde in unserem Laboratorium von *Collazo* bei Tauben, Hühnern und Meerschweinchen folgendes Verhalten des Blutzuckers festgestellt: Bei Beginn der Avitaminose geht der Blutzucker herunter, bleibt dann einige Zeit auf diesem niedrigen Niveau, um dann bis zu einer sehr erheblichen Hyperglykämie anzusteigen. Trotzdem die glykogenbildende Funktion nicht ganz erloschen ist, besteht bei allen Versuchstieren ein Glykogenmangel in Muskulatur und Leber — besonders in der letzten (siehe auch *Funk* und *Schönborn*, *Ogata*, *Abderhalden*). Die Glykogenwerte bei der Avitaminose sind geringer als die entsprechenden Werte bei Hungertieren.

Wir finden also in den drei Zuständen des „echten" Hungers, der Avitaminose und des Zellsalzhungers dem Prinzip nach ähnliche Störungen des Kohlehydratstoffwechsels, die in der Erhöhung der Blutzuckerwerte und Herabsetzung des Glykogengehaltes ihren Ausdruck finden. Während dem Glykogenschwund beim Hunger ein tatsächlicher Kohlehydratmangel zugrunde liegt, stehen dem Körper bei der Avitaminose und im Zellsalzhunger genügende Zuckermengen zur Verfügung. Für die Herabsetzung des Glykogengehaltes bei der Avitaminose und beim Zellsalzhunger muß man die Annahme der gestörten Glykogenbildung oder Glykogenspeicherung heranziehen. Für die letzte Annahme sprechen die Versuche von *Rubino* und *Collazo*. Es würde so auch die Hyperglykämie ungezwungen erklärt werden. Es scheint aber, daß der Vitaminmangel hier eine viel bedeutendere Rolle spielt, als der Zellsalzmangel — wie auch die hochgradigen Veränderungen im Blutzuckerspiegel und im Leberglykogen bei der Vitaminentziehung an eine spezifische Funktion der Vitamine für den Zuckerumsatz der Zelle denken lassen (*Collazo*). *Demgegenüber glauben wir, daß durch den Zellsalzmangel eine unspezifische Zellschädigung erfolgt, die sich in genannten geringgradigen Veränderungen äußert.* Vielleicht wären auch die Störungen des Kohlehydratstoffwechsels beim Zellsalzhunger wie die Herabsetzung des Gesamtumsatzes (s. erste Mitteilung) als eine Reaktion der Zellen auf eine unspezifische Schädigung möglicherweise im Sinne der Nahrungsersparnis zu werten.

Kalium und Calcium rufen nur geringfügige Änderungen im Blutzuckerspiegel und Glykogengehalt der Leber hervor. Kalium hat kaum eine deutliche Wirkung, Calcium macht in der angewandten Versuchsanordnung im allgemeinen eine Hyperglykämie geringen Grades. Es decken sich also unsere Befunde bei chronischer Salzanreicherung mit den Versuchen von *Hochfeld* mit intravenösen Salzinjektionen. Er konnte auch bloß geringe, kaum über 10 Proz. gehende Änderungen des Blutzuckers nachweisen. Es scheint also, daß die von *Zondek* aufgestellte Lehre von der prinzipiellen Gleichheit der Kalium-Calciumwirkung und der Sympathicus-Parasympathicuswirkung sich auf die Beeinflussung des Stoffwechsels nicht erstreckt. Denn sonst müßte man bei chronischer Anreicherung des Körpers mit Kalium bzw. Calcium eine Umstimmung des vegetativen Nervensystems und die Einstellung des Zuckerstoffwechsels gegenüber dem normalen Sympathicus-Parasympathicusgleichgewicht in einem Falle auf ein hyperglykämisches, im anderen auf ein hypoglykämisches Niveau erwarten. Auch die Bestimmungen des Leberglykogens, die keine wesentlichen Abweichungen von dem normalen Durchschnitt ergaben, liefern keine Anhaltspunkte für die Annahme einer erheblicheren Bedeutung der Kalium-Calciumionen für die Regulation des Zuckerstoffwechsels. Auf Grund unserer Versuche scheinen die Kalium-Calciumionen auch für den Zuckertransport im Sinne von *Arnoldi* wenig Bedeutung zu haben. Allenfalls entspricht die chronische Anreicherung mit dem betreffenden Salze in Form der peroralen Zufuhr in der Nahrung mehr den physiologischen Verhältnissen, als das plötzliche Überschütten des Organismus mittels einer intravenösen Salzinjektion, wobei man Nebenwirkungen kaum ausschalten kann und wobei eine Konzentration des betreffenden Ions im Blute erreicht wird, wie sie physiologisch wohl nicht in Betracht kommt.

Es schien von vornherein wahrscheinlich, daß eine Phosphatanreicherung des Organismus auf den Kohlehydratstoffwechsel von Einfluß sein wird. Aus den Untersuchungen der *Embden*schen Schule wissen wir, daß die Phosphorsäure für die physiologische Zuckerverwertung im Muskel von ausschlaggebender Bedeutung ist. Eine der wichtigsten Etappen des normalen Kohlehydratabbaues bildet die Hexosediphosphorsäure, die eine Voraussetzung für die Bildung von Milchsäure zu sein scheint. Die Untersuchungen von *Elias* sprachen in demselben Sinne.

Unsere Versuche ließen aber nur insofern einen Einfluß der Phosphatanreicherung auf den Blutzuckerspiegel und den Glykogengehalt der Leber erkennen, als die Zuckerwerte ungefähr denen der mit vollem Salzgemisch ernährten Ratten entsprechen und etwas unter den Werten der zellsalzarm ernährten Tiere liegen.

Unseres Erachtens liegt hier aber kein Widerspruch gegenüber *Elias* und *Weiss* vor. Abgesehen davon, daß es sich bei den Versuchen der genannten Autoren um intravenöse Injektionen handelte, konnte auch von

ihnen kein Einfluß auf den normalen Blutzuckerspiegel festgestellt werden. Bloß die hyperglykämischen Werte erfuhren eine Herabsetzung. Nun liegt die Sache bei unseren Versuchen so, daß die zellsalzarm ernährten Tiere eine wenn auch nicht erhebliche Hyperglykämie aufweisen, diese Tiere, die Kochsalz + Phosphat erhielten, normale Blutzuckerwerte. *Es wurde also die durch den Zellsalzmangel hervorgerufene Hyperglykämie durch die Phosphatzulage zur Nahrung wieder wettgemacht und die Zuckerwerte zur Norm gebracht.*

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung zellsalzarmer Ernährung und die einzelner Salze bei chronischer peroraler Zufuhr auf den Blutzuckerspiegel und Glykogengehalt der Leber bei Ratten studiert.

1. Die zellsalzarm ernährten Tiere weisen eine nicht erhebliche Erhöhung des Blutzuckerspiegels und Verminderung des Leberglykogens auf.

2. Kalium hatte keine wesentliche Wirkung.

3. Calcium rief eine geringfügige Erhöhung des Blutzuckerspiegels hervor. Der Glykogengehalt wies keine nennenswerte Veränderung auf.

4. Durch Phosphatzusatz zur zellsalzarmen Nahrung wird der Blutzuckerspiegel normal. Der Glykogengehalt der Leber zeigte keine eindeutigen Veränderungen.

Experimenteller Teil.

Die Nahrung bestand aus Reis, Weizeneiweiß, Butter und Citronensaft. Aus den gesamten Nahrungsmitteln wurde mit destilliertem Wasser ein Brei gekocht, und zwar kamen auf 8 Teile Reis 3 Teile Weizeneiweiß, 1 Teil Butter und 1 Teil filtrierter Citronensaft. Butter und Citronensaft wurden dem abgekühlten Brei zugesetzt. Die Tiere wurden zweimal täglich gefüttert, und zwar mit überreichlichen Breimengen.

Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach *Bang* ausgeführt, die Leber zur Glykogenbestimmung nach *Pflüger* verarbeitet. Die Tiere wurden 12 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme getötet und die Untersuchungen sofort durchgeführt.

Tabelle I. Die Tiere bekommen 0,3 g des folgenden Salzgemisches pro Ratte und Tag: Kochsalz 100 g, Chlorkali 30 g, Natriumphosphat 40 g, Calciumchlorid 40 g, Eisencitrat 20 g, Magnesiumcitrat 20 g.

	Körpergewicht g	Zahl der Versuchstage	Blutzucker Proz.	Glykogengehalt der Leber g
Ratte 1 . . .	105	36	0,050	0,045
„ 2 . . .	102	38	0,069	0,060
„ 3 . . .	98	40	0,050	0,067
„ 4 . . .	100	41	0,060	0,060
„ 5 . . .	110	34	0,083	0,100
„ 6 . . .	92	32	0,056	0,035
„ 7 . . .	95	30	0,050	0,040
„ 8 . . .	99	28	0,070	0,120
„ 9 . . .	101	27	0,065	0,035
		Durchschnittlich:	0,061	0,062

Tabelle II. Zellsalzarme Ernährung. Anstatt des Salzgemisches 0,10 g NaCl pro Tag und Ratte. Ratten 15 bis 18: 0,25 g NaCl pro Tag und Ratte.

	Körpergewicht g	Zahl der Versuchstage	Blutzucker Proz.	Glykogengehalt der Leber g
Ratte 10 . .	100	35	0,060	0,051
„ 11 . .	105	32	0,070	0,031
„ 12 . .	110	40	0,090	0,062
„ 13 . .	92	45	0,087	0,054
„ 14 . .	100	38	0,130	0,031
„ 15 . .	98	42	0,083	0,040
„ 16 . .	95	41	0,100	0,035
„ 17 . .	101	35	0,090	0,026
„ 18 . .	89	36	0,083	0,030
		Durchschnittlich:	0,088	0,040

Tabelle III.

Kaliumversuche. 0,15 g Kochsalz + 0,06 g Kaliumchlorid pro Tag und Tier.

	Körpergewicht g	Zahl der Versuchstage	Blutzucker Proz.	Glykogengehalt der Leber g
Ratte 19 . .	108	36	0,056	0,046
„ 20 . .	95	40	0,067	0,068
„ 21 . .	98	43	0,090	0,035
„ 22 . .	86	39	0,120	0,028
„ 23 . .	92	46	0,100	0,029
„ 24 . .	99	43	0,060	0,040
„ 25 . .	112	37	0,089	0,076
„ 26 . .	106	38	0,090	0,063
		Durchschnittlich:	0,084	0,048

Tabelle IV.

Calciumversuche. 0,15 g Kochsalz + 0,10 g Calciumchlorid pro Tag und Tier.

	Körpergewicht g	Zahl der Versuchstage	Blutzucker Proz.	Glykogengehalt der Leber g
Ratte 27 . .	100	39	0,130	0,065
„ 28 . .	102	41	0,120	0,040
„ 29 . .	98	43	0,085	0,060
„ 30 . .	97	38	0,078	0,024
„ 31 . .	96	34	0,100	0,039
„ 32 . .	89	36	0,085	0,040
„ 33 . .	96	39	0,094	0,048
„ 34 . .	93	44	0,079	0,035
„ 35 . .	99	41	0,120	0,038
		Durchschnittlich:	0,099	0,042

Tabelle V. Phosphatversuche. 0,15 g Kochsalz + 0,06 g Natriumphosphat pro Tag und Ratte.

	Körpergewicht g	Zahl der Versuchstage	Blutzucker Proz.	Glykogengehalt der Leber g
Ratte 36 . .	120	36	0,050	0,060
„ 37 . .	110	37	0,060	0,038
„ 38 . .	98	40	0,053	0,039
„ 39 . .	91	43	0,070	0,063
„ 40 . .	100	40	0,058	0,048
„ 41 . .	96	35	0,081	0,080
„ 42 . .	93	34	0,063	0,090
„ 43 . .	105	39	0,049	0,049
„ 44 . .	90	41	0,090	0,057
„ 45 . .	91	44	0,060	0,070
		Durchschnittlich:	0,0634	0,0594

Literatur.

Abderhalden, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **197**, 1922. — *Arnoldi*, Zeitschr. f. klin. Med. **94**, 1922. — *Arnoldi* und *Ettinger*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 42. — *Arnoldi* und *Roubitschek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8; Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 22. — *Belak*, diese Zeitschr. **44**, 1912. — *Chiari* und *Januschke*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **65**, 1911. — *Collazo*, diese Zeitschr. **134**, 1922; **136**, 1923. — *Eisner*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **112**, 1913. — *Elias* und *Weiss*, Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 959. — *Fischer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **106**, 1905. — *Funk* und *Schönborn*, Journ. of Physiol. **48**, 1914. — *Hamburger* und *Brinkman*, diese Zeitschr. **88**, 1918. — *Hochfeld*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**, 1923. — *Jakoby* und *Rosenfeld*, diese Zeitschr. **69**, 1915. — *Lorant*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 43. — *P. Mayer*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 25. — *Mc. Guigan*, Amer. Journ. of physiol. **26**, 1910. — *Naito*, The Tohoku Journ. of exper. Med. **1**, 1920. — *Ogata*, zitiert nach *Collazo*. — *Rubino* und *Collazo*, diese Zeitschr. **140**, 1923. — *Schenk*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **12**, 1921. — *Wilenko*, Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. **66**, 1911. — *S. G. Zondek*, diese Zeitschr. **132**, 1922; Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 9.

Über die Löslichkeit harnsaurer Salze. II.

Von

Georg Barkan.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Würzburg.)

(Eingegangen am 21. Januar 1924.)

Vor etwa zwei Jahren wurde über Löslichkeitsversuche an primärem Natriumurat in frisch gefälltem, amorph-gelatinösem Zustande berichtet[1]). Es hatte sich für die beschriebene Formart eine gegenüber der beständigen kristallinischen im Mittel etwa um das 2½fache erhöhte Löslichkeit nachweisen lassen, die beim Lagern und bei längerer Berührung des Bodenkörpers mit dem Lösungsmittel deutlich abnahm. Auf die Bedeutung dieser Tatsache, unter anderem für die Auffassung vom Übersättigungszustand der Uratlösungen wurde damals bereits hingewiesen.

In der ausführlichen Mitteilung über das gleiche Thema[2]) wurde eine inzwischen erschienene Arbeit *Schades*[3]) erwähnt, die eine Fortsetzung früherer Untersuchungen des Autors über das „Harnsäurekolloid" bildet und mancherlei Berührungspunkte mit meinen eigenen Untersuchungen enthält. *Schade* studierte die Eigenschaften der nach seinen früheren Angaben[4]) hergestellten Uratgallerten sowie diejenigen der übersättigten Uratlösungen. Was den Charakter der letzteren betrifft[5]), so hat sich der Autor jetzt davon überzeugt, daß es sich um echte Lösungen handelt, was insbesondere durch Leitfähigkeitsmessungen neben einer Reihe anderer Methoden bewiesen wird. Beim Vorgang der Ausfällung wird jeder sichtbaren Inhomogenität vorausgehend ein Stadium der kolloiden Teilchengröße durchlaufen. Bei rascher Ausfällung unter bestimmten Bedingungen kommt dieses intermediär gebildete Kolloid als Gallerte zur Abscheidung. Diese Feststellungen sind überzeugend, problematisch ist aber die Erklärung für die „Löslichhaltung" der Urate in übersättigten Lösungen mit einer Stabilisierung des intermediär gebildeten Kolloides. Im Zusammenhange

---

[1]) *Barkan*, Vortrag in der Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. München, am 31. Januar 1922, vgl. Klin. Wochenschr. **1**, 502, 1922.

[2]) *Derselbe*, Zeitschr. f. Biol. **76**, 257, 1922.

[3]) *Schade*, Zeitschr. f. klin. Med. **98**, 1, 1922.

[4]) *Schade* und *Boden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 347, 1913.

[5]) Vgl. *Kohler*, Zeitschr. f. klin. Med. **78**, 205, 1913.

mit unseren früheren Untersuchungen interessiert an der *Schade*schen Arbeit ganz besonders das Verhalten der Uratgallerten. Es wurde für Na- und K-Uratgallerten bzw. für ganz frische Ausfällungen der beiden Salze bei 37° eine Löslichkeit festgestellt, die diejenige der beständigen kristallinischen Form in noch viel erheblicherem Maße übersteigt als wir es für die „amorph-gelatinöse“ Form der früheren Darstellungsart gefunden hatten. Gleichzeitig wurde auch für die Gallerten von *Schade* gezeigt, daß der Einfluß des Alterns sich in einer ausgesprochenen Abnahme der Löslichkeit geltend macht. Wichtig ist, daß nach den ausgeführten Leitfähigkeitsmessungen das Kolloid unter Ionenbildung „echt“ in Lösung geht, wie dies unsererseits für die in der ersten Mitteilung beschriebene Formart des Natriumurats angegeben war.

Die Ähnlichkeit der beobachteten Erscheinungen bei der von *Schade* und von mir beschriebenen Formart ist zu offensichtlich, um keinen Zusammenhang beider zu vermuten, und es erscheint daher am ungezwungensten, anzunehmen, daß die Gallerten beim Alterungsprozeß auch die von mir früher angegebene Zustandsform durchlaufen. Dies wird schon aus den beim Altern der Gallerten vor sich gehenden makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen wahrscheinlich. Danach würde es sich bei den beiden Formen nur um verschiedene Stadien auf dem Wege der Umwandlung von der kolloidalen Abscheidung zur beständigen, gröberteiligen, handeln. Die in der ersten Mitteilung erwähnte Analogie mit den verschiedenen reproduzierbaren Formen des Chlorsilbers, deren jede eine eigene Löslichkeit hat, wird dadurch beim Natriumurat noch augenfälliger[1]).

Es war zunächst von Interesse, zu prüfen, ob sich für das Kaliumurat bei entsprechendem Vorgehen wie beim Natriumurat eine ebenso reproduzierbare Zwischenformart würde gewinnen lassen[2]).

1. Versuche mit Kaliumurat nach Art der früheren Darstellung.

Zur Verfügung stand reinste Harnsäure (*Merck*). Die Lösung einer genau gewogenen Menge hiervon in Wasser mit der äquivalenten Menge 1 n KOH erfolgte wie in der ersten Mitteilung beschrieben. Für je 100 ccm Flüssigkeit wurde etwa 1 g Harnsäure verwendet[3]). Nach der Angabe *Gudzents*[4]) wurde zweckmäßigerweise das Lösungswasser beim K-Urat auf 70 bis 80° erwärmt. Die heiße Lösung wurde vom meist sehr geringen ungelösten Rest abfiltriert und das Filtrat eisgekühlt aufgefangen. Bei diesem Vorgehen fällt als Unterschied gegenüber dem Na-Urat auf, daß meist bereits nach wenigen Minuten Opaleszenz und Trübung der stark

[1]) Vgl. *Drucker*, Kolloid-Zeitschr. 4, 216, 1909.

[2]) Herrn Dr. *Fritz Lehmann*, seinerzeitigem Medizinalpraktikanten der Klinik, dessen Mitarbeit ich mich bei der Mehrzahl folgender Versuche zu erfreuen hatte, danke ich auch an dieser Stelle bestens.

[3]) Die Angabe S. 258 der ersten Mitteilung, „0,5 g Harnsäure auf 500 ccm Wasser“, beruht auf einem Druckfehler. Es muß natürlich heißen: 5,0 g Harnsäure.

[4]) *Gudzent*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 150, 1908.

übersättigten Lösung eintritt, die aber meist nur langsam in dicke Flockung übergeht. In verschiedenen Zeitpunkten vom Beginn der Herstellung an, zwischen 10 und 30 Minuten, je nach der sehr wechselnden Geschwindigkeit des Ausfällungsvorganges, wurde auf der Nutsche abgesaugt. Hierbei zeigte sich stets, daß das zurückbleibende Urat das Wasser noch sehr viel zäher zurückhält als es beim Natriumurat der Fall ist. Unter Druck von 1 Atm. an der Saugpumpe bleibt eine zerfließende, keineswegs plastische Masse zurück. Erst beim Nachpressen gelingt es mit Mühe, die Substanz etwas mehr zu trocknen. Das Nachwaschen erfolgte wie beim Natriumurat. Das mikroskopische Aussehen der schließlich zur Verfügung stehenden Substanz, die durchaus nicht so leicht reproduzierbar ist, wie das Na-Salz gleicher Darstellungsart, weicht von diesem nicht ab, zeigt amorphe Teilchen und keine Tröpfchenbildung. Daß bei diesem differierenden Verhalten auch die Löslichkeit nicht annähernd so definiert ist, wie beim früher beschriebenen Natriumurat, nimmt nicht wunder. Was die Methode der Löslichkeitsbestimmung betrifft, so wird auf die erste Mitteilung verwiesen. Die Versuchstemperatur war 18°. Die Uratbestimmung erfolgte durch Mikrokjeldahl.

In einer Anzahl verschiedener K-Urate wurden folgende Werte nach einstündiger Schütteldauer erhalten (Tabelle I).

Tabelle I.

Löslichkeit frisch gefällten amorphen Kaliumurates bei 18° nach einstündiger Schütteldauer im Vergleich mit derjenigen der kristallinischen Form.

Urat	g/Liter	Millimol/Liter
Gudzents unbeständige Lactamform (berechnet)	2,10	10,2
Gudzents beständige Lactimform (gefunden)	1,40	6,8
IV, 23	2,14	10,4
IV, 26	1,72	8,3
IV, 53	1,81	8,8
IV, 55	2,38	11,6

Eine weitere Unsicherheit für die Löslichkeitsbestimmung entsteht durch den sehr verschiedenen Zeitpunkt der Sättigung für die einzelnen Präparate, so daß der Vergleich der 1-Stundenwerte etwas Willkürliches hat. Die folgende Tabelle II bringt für die vier angeführten K-Urate das Verhalten der Löslichkeit nach verschieden langer Berührung des Bodenkörpers mit der Lösung im Rotationsthermostaten bei 18°.

Die Sättigung ist bei Urat IV, 26 selbst nach 4 Stunden nicht erreicht, der Wert nach 48 Stunden liegt noch beträchtlich höher als letzterer. IV, 53 zeigt nach 72½ Stunden eine vielleicht innerhalb der Fehlergrenzen liegende Zunahme, während IV, 23 und IV, 55 eine sehr deutliche Abnahme im Laufe der Beobachtungszeit aufweisen. Die Abnahme, wo sie überhaupt festzustellen ist, ist sehr langsam, sehr viel langsamer als es beim Na-Urat der Fall zu sein pflegt. Ein Einfluß des Rotierens macht sich dabei nicht

wesentlich geltend, wie beispielsweise die beiden letzten Spalten bei Urat IV, 55 (gleich lange Gesamtdigestion und verschieden lange Rotation) zeigen.

Man gelangt also bei analogem Vorgehen nicht wie beim Natriumurat zu einer einheitlichen Formart mit wohldefinierter Löslichkeit.

Tabelle II.

Verhalten der Löslichkeit beim K-Urat nach verschieden langer Zeit.

Urat	Gesamtdauer der Digestion in Std.	Rotationsdauer in Std.	g/Liter	Millimol/Liter
IV, 23 . . .	1	1	2,14	10,4
	$2^1/_2$	$2^1/_2$	2,07	10,0
	$3^1/_2$	$3^1/_2$	2,10	10,2
	$26^1/_2$	$9^1/_2$	2,05	9,9
	$120^1/_2$	$35^1/_2$	1,91	9,3
IV, 26 . . .	1	1	1,72	8,3
	2	2	1,88	9,1
	4	4	1,88	9,1
	48	18	2,13	10,3
IV, 53 . . .	1	1	1,81	8,8
	$72^1/_2$	$14^1/_2$	1,88	9,1
IV, 55 . . .	1	1	2,38	11,6
	77	$1^1/_4$	2,02	9,8
	77	19	1,98	9,6

Errechnet man, um die Größenordnung der Löslichkeit annähernd zu erhalten, das Mittel aus den jeweils gefundenen Höchstwerten, so bekommt man 2,13 g $= 10{,}35 \times 10^{-3}$ Mol pro Liter. Das bedeutet eine gegenüber der beständigen kristallinischen Form um nur etwa das 1,5fache gesteigerte Löslichkeit, während dieser Faktor beim Na-Urat über 2,5 betragen hatte.

2. Löslichkeitsversuche an Uratgallerten.

Schade hat, wie bereits eingangs erwähnt, den Lösungsvorgang von Kalium- und Natriumurat im Zustande der frischen kolloidalen Ausfällung untersucht[1]). Zur Bestimmung der Löslichkeit des Kolloids bei 37° wurde so vorgegangen, daß er aus übersättigten Uratlösungen abgestufte Verdünnungen herstellte, diese durch rasche Eiskühlung zum Ausfallen brachte und nun beobachtete, bei welcher Konzentration nach Wiedererwärmen der Lösungen auf 37° eben wieder völlige Klärung eintrat. Auf diese Weise wurde die Löslichkeitsgrenze der frischen Kolloidform bei 37° bestimmt:

Kaliumurat . . . . 1,2 : 100
Natriumurat . . . . 0,91 : 100

Diese Zahlen werden mit den Löslichkeitswerten der beständigen kristallinischen Form verglichen. Rechnet man den Wert beim Natriumsalz auf das kristallwasserhaltige Urat um, was für den Vergleich notwendig ist, jedoch, wie die Durchsicht der Tabelle S. 10 a. a. O. ergibt, offenbar irrtüm-

[1]) *Schade*, Zeitschr. f. klin. Med. **93**, 1, 1922.

licherweise unterblieb, so würde der korrigierte Wert für die von *Schade* gefundene Löslichkeit beim Na-Urat in Kolloidform 0,99 : 100 lauten.

Wir bestimmten nun nach der von uns bisher angewandten Methode gleichfalls die Löslichkeit der nach *Schades* Vorschrift hergestellten K- und Na-Uratgallerten in Wasser bei 18°. Wir vermieden sorgfältig einen Überschuß an der verwendeten n/10 Alkalilösung und filtrierten von einem etwa ungelösten Harnsäurerest rasch ab. Die Reaktion der so gewonnenen übersättigten Lösung, deren Wasserstoffzahl wir allerdings nicht bestimmten, wird demnach eine der Hydrolyse entsprechende schwach alkalische gewesen sein. Die heiße, nach dem Filtrieren nochmals kurz aufgekochte Lösung wurde nun in auf Eis vorgekühlte kleine Reagenzgläschen oder schmale Bechergläschen gegossen. Es bildeten sich nach wenigen Minuten mehr oder weniger durchscheinende Gallerten. Diese wurden nun, sobald sie vollständig ausgebildet waren, in reichlichem Überschuß auf eine Reihe kleiner Erlenmeyerkölbchen mit einem abgemessenen Quantum destillierten Wassers verteilt. Beim Übertragen der Urate zeigte sich meist bereits sofort ein käsig-flockiger Zerfall. Jedenfalls blieben hierbei die Gallerten in glasig-durchscheinendem Zustande nie erhalten. Nach Abfüllung der Kölbchen wurden diese unter Gummistopfenverschluß sofort 5 Minuten mit der Hand gut durchgeschüttelt. Der Inhalt eines Teiles der Kölbchen wurde nun sofort analysiert, während die anderen in den *Ostwald*schen Schüttelthermostaten kamen und bei 18° verschieden lange Zeit rotierten. Da die Zimmertemperatur mit einiger Genauigkeit 18° betrug, glauben wir die Löslichkeitswerte nach 5 Minuten den übrigen einfügen zu dürfen. Es zeigte sich, daß die so gewonnenen Lösungen durch Papierfilter im Gegensatz zu denen anderer Formarten der Urate völlig klar filtrierten. Es konnte daher auf die früher benutzte Porzellankerze in der Mehrzahl der Fälle verzichtet werden, was sehr von Vorteil war, wenn es sich um kurz dauernde Versuche handelte, die wegen der raschen Zustandsänderung der Urate notwendig wurden. Auf besondere Filtrationsversuche wird noch an anderer Stelle dieser Mitteilung eingegangen werden.

Bei dem sehr veränderlichen Charakter der Gallerten ist die große Differenz der bei den einzelnen Präparaten erhaltenen Löslichkeitswerte kaum erstaunlich. Maßgebend sind naturgemäß die höchsten Werte, ferner ist wichtig das Verhalten der Löslichkeit bei längerer Schütteldauer. Der Sättigungspunkt lag beim K-Urat zwischen 5 Minuten und 1 Stunde. Jedenfalls nahm nach 1 Stunde der Wert bereits wieder ab. Beim Na-Urat lag der Wert nach 1 Stunde regelmäßig bereits niedriger als derjenige nach 5 Minuten. Die beiden folgenden Tabellen (Tabelle III und IV) bringen in einigen Beispielen aus zahlreichen weiteren Versuchen die einschlägigen Verhältnisse zum Ausdruck.

Die höchsten überhaupt gefundenen Werte sind:

beim Kaliumurat 6,67 g $= 32{,}4 \times 10^{-3}$ Mol pro Liter,

beim Natriumurat 5,35 g $= 25{,}7 \times 10^{-3}$ Mol pro Liter,

beides nach 5 Minuten Schütteldauer.

Falls es berechtigt ist, den aus der Löslichkeitsdifferenz bei 18 und 37° nach *Gudzent*[1]) für die kristallinischen Salze sich ergebenden

[1]) *Gudzent*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 66—67, 1909.

Temperaturkoeffizienten auf die unbeständige kolloide Formart zu übertragen, was hier mit allem Vorbehalt geschehen soll, so entsprächen die hier bei 18° gefundenen höchsten Werte folgenden bei 37°:

Kaliumurat . . . . 11,9 pro Liter,
Natriumurat . . . . 9,6 pro Liter.

Diese Zahlen decken sich, wie man sieht, fast vollständig mit den von *Schade*[1]) gefundenen:

Kaliumurat . . . . 12,0 pro Liter,
Natriumurat. . . . . 9,9 pro Liter.
(Letzteres korrigiert aus 9,1, vgl. S. 450.)

Tabelle III. Löslichkeit des K-Urates in frischer Kolloidform bei 18°.

Urat	Gesamtdauer der Digestion	Rotationsdauer	g/Liter	Millimol/Liter
IV, 30 . . .	1/4 Std.	1/4 Std.	4,97	24,1
	1 „	1 „	5,27	25,6
IV, 31 . . .	1 „	1 „	5,27	25,6
	2 „	2 „	4,70	22,8
	22 „	9 „	3,36	16,3
IV, 43 . . .	1 „	1 „	5,35	26,0
	5 „	5 „	4,17	20,2
IV, 45 . . .	5 Min.	5 Min.	6,67	32,4
	1/4 Std.	1/4 Std.	6,52	31,6
	1 1/4 „	1 1/4 „	6,18	30,0
IV, 58 . . .	5 Min.	5 Min.	4,64	22,5
	1/4 Std.	1/4 Std.	5,15	25,0
	1 „	1 „	4,52	21,9
IV, 62 . . .	5 Min.	5 Min.	6,00	29,1
	10 „	10 „	6,00	29,1

Tabelle IV. Löslichkeit des Na-Urates in frischer Kolloidform bei 18°.

Urat	Gesamtdauer der Digestion	Rotationsdauer	g/Liter	Millimol/Liter
IV, 33 . . .	1 Std.	1 Std.	3,65	17,6
	24 „	9 „	2,43	11,7
IV, 35 . . .	1 „	1 „	3,22	15,5
	5 3/4 „	5 3/4 „	2,87	13,8
	24 „	24 „	2,38	11,4
III, 88 . . .	5 Min.	5 Min.	4,10	19,7
	1 Std.	1 Std.	3,50	16,8
III, 92 . . .	5 Min.	5 Min.	4,50	21,6
	1 Std.	1 Std.	2,85	13,7
III, 95 . . .	5 Min.	5 Min.	5,35	25,7
	1 Std.	1 Std.	3,22	15,5

[1]) *Schade*, Zeitschr. f. klin. Med. **93**, 11, 1922.

Neuerdings haben *Rona* und *Meyer*[1]) das Verhalten des Harnsäuregels bei der Dialyse studiert. Die Autoren, die Lithiumuratgallerten gegen eine bestimmte Menge Wasser dialysierten, ziehen aus ihren Versuchen den Schluß, daß sich 60 Proz. des Urates in kolloidalem Zustande befinden, da sie nicht mehr als 20 Proz. der Gesamtmenge in der Außenflüssigkeit fanden. Es ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß es sich bei den Versuchen um die Einstellung eines Lösungsgleichgewichtes handelt, entsprechend der echten Löslichkeit des Lithiumurates in Gallertform, worüber Löslichkeitsversuche an diesem Aufschluß geben würden. Die vermißte Zunahme im Uratgehalt der Außenflüssigkeit fände dann in der Erreichung des Sättigungszustandes ihre Erklärung, die fehlende Abnahme andererseits in der bekannten relativen Beständigkeit der Lithiumuratgallerten. Diese Überlegung schließt sich an die von *Schade* gegebene Deutung der *Schilling*schen Dialyseversuche an.

8. Zur Theorie der Löslichkeitsänderung.

Überblickt man das bisherige Tatsachenmaterial, so ergibt sich aus *Schades* und den eigenen Untersuchungen folgendes. Bringt man Urate aus stark übersättigten Lösungen durch starke Abkühlung unter bestimmten Kautelen zum raschen Ausfall, so erfolgt die Abscheidung zunächst in kolloidaler Form. Aus dieser Formart wandeln sich die Salze allmählich mehr oder weniger schnell unter Durchlaufung verschiedener Zwischenstufen zu beständigen Substanzen um, die sich entweder als erkennbar kristallinisch oder aber, wie ich es früher beschrieb, als amorph bzw. mikrokristallinisch erweisen. Beim Natriumurat konnte eine gut reproduzierbare Zwischenform beobachtet werden (vgl. Mitteilung I), während eine solche beim Kaliumurat in nicht so ausgeprägter Weise auftritt. Beim Durchlaufen dieser physikalischen Zustandsänderungen der Salze erfährt ihre Löslichkeit eine sehr charakteristische Änderung. Die anfänglich sehr hohen Löslichkeiten nehmen allmählich ab und streben den bekannten Werten für die beständige kristallinische Form zu. Es ist *Schade* völlig Recht zu geben, wenn er die von *Gudzent*[2]) seinerzeit erstmalig beschriebene Löslichkeitsabnahme an seinen kristallinischen Uraten nur als einen „kleinen Teil der Strecke" des Gesamtvorganges bezeichnet. Ich selbst habe mich in ähnlichem Sinne ausgesprochen[3]).

Ist somit die Löslichkeitsabnahme der Urate von verschiedenen Seiten beobachtet, so scheint mir eine einheitliche Erklärun hierfür bisher nicht gegeben zu sein; denn auch die sehr bemerkenswerten Darlegungen *Schades* scheinen mir nicht allen Erfahrungstatsachen gerecht zu werden. Es ist sicher, daß die Löslichkeitsänderung ursächlich verbunden ist mit der physikalischen Zustandsänderung der festen Urate, wie dies aus den Erfahrungen an den alternden Uraten hervorgeht (*Schade*, *Barkan*). Eine Erklärung, die das Wesentliche des Vorganges auf molekulare Veränderung in der Lösung selbst bezieht, wie dies *Gudzent* in seiner Lactam-Lactimhypothese für den von ihm

---

[1]) *Rona* und *Meyer*, diese Zeitschr. **143**, 161, 1923.
[2]) *Gudzent*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 150, 1908; **60**, 38, 1909.
[3]) *Barkan*, Zeitschr. f. Biol. **76**, 265, 1922.

studierten Bezirk der Löslichkeitsabnahme tut, ist mit den neueren erweiterten Erfahrungen nicht mehr vereinbar[1]). Nach energetischen Überlegungen und allgemeinen Erfahrungen müssen unbeständige Formarten irgendwelcher Stoffe stets einen höheren Dampfdruck und demgemäß auch eine größere Löslichkeit haben als die beständigen. Wenn also *Schade*[2]) als Analogiebeispiel die „unterkühlte Schmelze" anführt, so trifft diese Analogie das Richtige, sofern sie die Betonung auf die Unbeständigkeit der betreffenden Formart legt, sie scheint mir dagegen irrtümlich, wenn mit dem Auftreten der „flüssigen Formart" für die Urate die Überlegenheit der Löslichkeit in Kolloidform ihre spezielle Erklärung finden soll. Einmal scheint aus den neueren Untersuchungen von *Keeser* und *Zocher*[3]) an Uratgallerten hervorzugehen, daß es sich hierbei nicht um ein Kolloid mit flüssiger disperser Phase handelt, sondern daß diese fest ist. Ferner aber würde, selbst wenn die Annahme *Schades* für die Gallerten zuträfe, keine Erklärung gegeben sein für die noch stark erhöhte Löslichkeit der verschiedenen Zwischenformen, bei denen sicherlich nicht mehr an einen flüssigen Dispersionszustand gedacht werden kann. Erinnert sei besonders an die Erfahrungen beim Natriumurat früherer Darstellungsart. Es erscheint uns nicht gerechtfertigt, die Löslichkeitsverhältnisse des „$\bar{\text{U}}$-Kolloids" in Gegensatz zu stellen zu denen des „$\bar{\text{U}}$-Kristalloids"[4]). Das Kontinuierliche des Vorganges, der Löslichkeitsabnahme, das *Schade* mit Recht betont[5]), muß naturgemäß in der Erklärung zum Ausdruck kommen. Sie scheint uns mit großer Wahrscheinlichkeit gegeben in der kontinuierlichen Änderung der Teilchengröße bei den verschiedenen Formarten.

Gudzent[6]) hat für die von ihm beobachteten Erscheinungen an den kristallinischen Präparaten diese Erklärung verworfen und *Schade* meint, daß dieser Faktor „für die Frage der Löslichkeit Berücksichtigung bedarf", daß er aber „zumeist an Bedeutung gegenüber der Löslichkeitsabnahme beim Übergang der kolloiden Phase zum festen Aggregatzustand zurückstehen wird". Allerdings kommen als „Einzelteilchen" eben nicht die Tröpfchen der Gallerte in Betracht; ihr Anwachsen auf Kosten kleinerer Tropfen in der feuchten Kammer unter dem Mikroskop (*Schade*) spricht meines Erachtens weder für noch gegen die Erklärung. *Die zunehmende Größe der festen Uratteilchen allein von kolloidalen, also ultramikroskopischen bis zu mikroskopischen Dimensionen ist für die abnehmende Löslichkeit offenbar wesentlich verantwortlich.* Die Bedeutung des Einflusses

[1]) In seiner letzten Veröffentlichung ist *Gudzent* selbst geneigt, seine Hypothese zurückzustellen. Zeitschr. f. klin. Med. **99**, 20, 1923.

[2]) *Schade*, a. a. O., S. 14—15.

[3]) *Keeser* und *Zocher*, Kolloidchem. Beihefte **17**, 189, 1923.

[4]) *Schade*, a. a. O., S. 30.

[5]) *Derselbe*, a. a. O., S. 33.

[6]) *Gudzent*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 171—173, 1908.

der Teilchengröße ist durch *Wilh. Ostwald*[1]) und *Hullet*[2]) nicht nur theoretisch begründet, sondern auch experimentell erwiesen, und für das von mir wiederholt genannte Analogiebeispiel beim AgCl finde ich im Lehrbuch von *Wolfg. Ostwald*[3]) den abnehmenden Dispersionsgrad als Erklärung für die verschiedene Löslichkeit der einzelnen Niederschlagsformen des Chlorsilbers angegeben. Allerdings macht sich der Einfluß des Dispersitätsgrades auf die Löslichkeit erst unterhalb einer gewissen Teilchengröße nachweislich geltend, wie das auch aus thermodynamischen Erwägungen zu erwarten ist[4]). So bestimmte *Hullet* hierfür beim Gips einen Teilchendurchmesser von 2 μ als obere Grenze. *Ist für die Abgrenzung nach unten bei den Uraten durch den Kolloidcharakter der Gallerten die Größenordnung der Teilchen festgelegt, so ermöglicht folgende kleine Tabelle (Tabelle V) eine wenn auch nur rohe Schätzung der Korngröße an gröberteiligen amorphen oder kristallinischen Uraten.* Gesättigte Lösungen der einzelnen Präparate wurden samt aufgewirbeltem Bodenkörper auf Filter verschiedener Porenweite gegeben. Der Zustand der Filtrate ist aus der dritten und vierten Längsspalte der Tabelle ersichtlich, an deren Kopf sich die verwendeten Filterkörper angegeben finden.

Nach den Untersuchungen *Bechholds*[5]) ist die größte Porenweite der Papierfilter Nr. 602 extra hart (Schleicher u. Schüll) mit 1 bis 1,5 μ, die der unglasierten Porzellankerze mit 0,16 bis 0,41 μ anzunehmen.

Tabelle V.

Filtration von Na-Uraten durch verschiedenporige Filter.

Urat	Formart	Zustand der Lösung bei Filtration durch	
		602 extra hart Schleicher u. Schüll	unglasierte Porzellankerze
III, 16 . .	im wesentlichen kristallinisch	deutl. Suspension	klar
III, 57 . .	kristallinisch	Opaleszenz	klar
III, 31 . .	amorph (nach längerem Lagern)	deutl. Suspension	klar
III, 54 . .	amorph-gelatinös	klar	klar

Die Schätzung der bei obigen Filtrationsversuchen passierenden Teilchen ergibt demnach einen Durchmesser $< 1{,}5$ und $> 0{,}41\,\mu$, bewegt sich also mit etwa 1 μ auch für die kristallinische Formart in der Größenordnung, bei welcher eine Beeinflussung der Löslichkeit noch in Betracht kommt.

Bei der Durchsicht der Tabelle fällt die Tatsache auf, daß das gelatinöse Urat auch durch das gehärtete Papierfilter zurückgehalten wird, obwohl es

[1]) *Wilh. Ostwald*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **34**, 495, 1900.

[2]) *Hullet*, ebendaselbst **37**, 385, 1901; **47**, 357, 1904.

[3]) *Wolfg. Ostwald*, Grundriß der Kolloidchemie I. S. 90. Dresden und Leipzig 1921.

[4]) Vgl. *W. Nernst*, Theor. Chem. 1921, S. 744.

[5]) *Bechhold*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **64**, 328, 1908.

doch zweifellos die geringere Teilchengröße hat. In noch ausgesprochenerem Maße ist das Verhalten bei den gesättigten Lösungen der Gallerten zu beobachten, die auch durch gewöhnliche, nicht gehärtete Papierfilter klar vom Bodenkörper abfiltriert werden können (vgl. S. 450). Daß hierbei vermutlich doch analytisch sich dem Nachweis entziehende Spuren „fester" Substanz das Filter passieren, wird aus den Beobachtungen des folgenden Abschnittes wahrscheinlich.

4. Das Verhalten übersättigter Uratlösungen.

Aus dem Vorhandensein einer Natriumuratform, die über 2½ mal löslicher ist als die beständige kristallinische, war in der ersten Mitteilung die Haltbarkeit entsprechend konzentrierter Natriumuratlösungen zu erklären versucht worden. Der *Kohler*sche „relative Übersättigungswert" von 2,5[1]) bot einen bemerkenswerten Anhaltspunkt in dieser Richtung. *Die Feststellungen Schades vom Vorhandensein noch weit löslicherer Formarten der Urate und die zahlenmäßige Bestimmung der entsprechenden Werte, mit denen die der vorliegenden Mitteilung in guter Übereinstimmung stehen, müssen konsequenterweise zu einer Erhärtung und Erweiterung der früher zu geben versuchten Theorie oder aber zu ihrer Ablehnung führen.* Die Betrachtung des Gesamtvorganges der Teilchenvergröberung im festen Urat vom Kolloid zur beständigen Formart und die daraus ableitbare Löslichkeitsabnahme nimmt der Tatsache, daß ein Kolloid sich echt zu Ionen löst, alles Erstaunliche. Die für das früher dargestellte gelatinöse Natriumurat gemachte Angabe, daß es sich bei seinen Lösungen um *echte* Lösungen handelt[2]), findet durch die eingehenden Untersuchungen *Schades* auch für das Urat in Kolloidform ihre Bestätigung und steht im Einklange mit den Verhältnissen beim AgCl[3]).

Beim Natriumurat in der Zwischenformart hatte sich die Haltbarkeit der vom Bodenkörper abfiltrierten Lösungen und damit ihre Charakterisierung als stabile Systeme experimentell nachweisen lassen. Dieser Nachweis ist für die vorliegenden Lösungen auf dem früher beschrittenen Wege *nicht* gelungen. Nach anfänglicher völliger Klarheit der filtrierten Lösungen zeigt sich bei Zimmertemperatur oder im Thermostaten bei 18° nach verschieden langer Zeit ein Ausfall, der verschieden schnell an Intensität zunimmt. Nach den bisherigen Erwägungen war dieses Verhalten keineswegs verständlich und nur Hinzufügen von fester Substanz, wenn auch nur in Spuren, ließ eine Störung des Gleichgewichtes erwarten. Bei der Durchsicht unserer diesbezüglichen Versuche stellte es sich nun heraus, *daß die angewandte Methodik die Gegenwart fester Substanz in den gesättigten Lösungen der unbeständigen Formarten nicht sicher auszuschließen gestattete.* Soweit die Filtration durch die früher verwendeten unglasierten Porzellankerzen erfolgte, hatte sich gezeigt, daß an den obersten Teilen des Saugröhrchens kleine Flüssigkeitstropfen hängen blieben, aus denen sich naturgemäß beim Verdampfen des Lösungsmittels während des Absaugens feinste Uratpartikelchen abscheiden mußten. Die Gegenwart festen Urates war also nachgewiesen. Aber auch beim Abtropfenlassen durch Papierfilter, die ja, wie erwähnt, ein klares Filtrat geben, scheinen feste Uratteilchen, deren Gegenwart sich dem chemischen Nachweis entzieht,

[1]) *Kohler*, Zeitschr. f. klin. Med. **87**, 190, 1919.
[2]) *Barkan*, Zeitschr. f. Biol. **76**, 257, 1922.
[3]) *Drucker*, Kolloid-Zeitschr. **4**, 216, 1909.

durchzugehen. Hierfür sprechen die *Versuche mit verschieden dichten Filtern* und die Unterschiede in der Geschwindigkeit des Ausfalles bei Filtration durch gehärtete und nicht gehärtete Filter.

Filtriert man nämlich gesättigte Lösungen der Urate in Gallertform durch gehärtete und gewöhnliche Papierfilter, so zeigt sich regelmäßig, daß bei gleicher, ja selbst bei höherer Uratkonzentration die durch Hartfilter geschickten Lösungen die haltbareren sind. Die folgende Tabelle (Tabelle VI) bringt zwei Beispiele hierfür. Bei solchen und ähnlichen Versuchen gewinnt man durchaus den Eindruck, daß es nicht der bezüglich der stabilen Form in der Lösung vorhandene Übersättigungsgrad, sondern die verschiedene Menge der passierenden festen Teilchen ist, von der die Geschwindigkeit des Ausfalles abhängt.

Tabelle VI.
Uratausfall bei Filtration durch verschieden dichte Filter.

Urat	Gehalt in g/Liter	Benutztes Filter Schleicher u. Schüll No.	Ausfall nach		Bemerkungen
			1 Tag	2 Tagen	
K-Urat IV, 62	6,00	595	+++	+++	
	6,00	575	klar	opal.	Am 4. Tage Zunahme des Ausfalles.
Na-Urat III, 92—93	3,87 [1])	595	++	+++	Bereits kurze Zeit nach der Filtration trat Opaleszenz ein.
	4,50 [1])	575	+	+	Zur gleichen Zeit noch völlig klar.

Nr. 595 Schleicher u. Schüll: nicht gehärtete Filter.
Nr. 575 Schleicher u. Schüll: gehärtete Filter.
+, ++, +++ = verschieden starker Ausfall.

Wenn aber tatsächlich die Haltbarkeit „übersättigter“ Lösungen ihre Erklärung finden soll in der Existenz freiwillig sich so viel besser lösender Formarten der Urate, dann muß verlangt werden, daß auf irgend einem Wege gewonnene Lösungen mit dem der höchsten Löslichkeit entsprechenden Gehalt bei sorgfältigem Fernhalten von Bodenkörper haltbar sind. Dieser Nachweis war noch zu erbringen.

Nach Abschluß der vorliegenden Versuche erschien nun kürzlich eine Arbeit von *Kohler* und *Krüger*[2]), die sich in Fortführung früherer Untersuchungen mit der Haltbarkeit übersättigter Natriumuratlösungen unter verschiedenen Bedingungen beschäftigten. Bei Zimmertemperatur waren in gepufferten Systemen von $p_H = 7{,}3$ und einer $Na^{\cdot}$-Konzentration von 0,02 n Natriumuratlösungen dauernd haltbar mit einem maximalen Gehalt von 3,9 g Harnsäure im Liter. Dies entspricht 4,82 g kristallwasserhaltigen Natriumurates. Der von uns bei

[1]) Der verschiedene Gehalt erklärt sich aus der Entnahme nach verschieden langer Schütteldauer.

[2]) *Kohler* und *Krüger*, Zeitschr. f. klin. Med. **97**, 381, 1923.

18^0 gefundene Höchstwert betrug 5,35. Berücksichtigt man die Tatsache, daß die Lösungen bei *Kohler* und *Krüger* beträchtliche Mengen Na enthielten, die die Löslichkeit erniedrigen mußten, so scheint die Forderung der Theorie in befriedigender Weise erfüllt. Die auffallende Tatsache, daß der Übersättigungsgrenzwert für das Na-Urat bei 37^0 nur unbeträchtlich höher lag als bei Zimmertemperatur, wie die genannten Autoren das fanden, bedarf weiterer Aufklärung.

Zusammenfassung.

1. Das in einer früheren Mitteilung beschriebene amorph-gelatinöse Natriumurat bildet eine Zwischenformart auf dem Wege der Umwandlung von der kolloiden zur beständigen gröberteiligen Zustandsform der Urate.

2. Beim Kaliumurat existiert keine entsprechend leicht reproduzierbare Zwischenformart mit gut definierter Löslichkeit. Die Löslichkeit der entsprechend dargestellten Kaliumurate bei 18^0 schwankt um das Mittel von 2,13 g $= 10{,}35 \cdot 10^{-3}$ Mol im Liter, ist also kaum höher als der beim Natriumurat gefundene Mittelwert.

3. Die höchsten aufgefundenen Löslichkeitswerte für die nach *Schade* hergestellten Gallerten waren bei 18^0 für Kaliumurat 6,67 g $= 32{,}4 \cdot 10^{-3}$ Mol im Liter, für Natriumurat 5,35 g $= 25{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mol im Liter. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit denen *Schades* bei 37^0.

4. Die wahrscheinlichste Erklärung für die abnehmende Löslichkeit der Urate beim Lagern und bei Berührung des Bodenkörpers mit der Lösung wird in dem kontinuierlichen Anwachsen der festen Uratteilchen erblickt.

5. Das Vorhandensein löslicherer Formarten gibt eine hinreichende Erklärung für die Haltbarkeit entsprechend konzentrierter, also bezüglich der schwerst löslichen Formen übersättigter Uratlösungen.

Zur Frage der Biochemie der experimentellen Tetanie.

(Harn- und Muskelkreatin bei der Guanidin- und parathyreopriven Tetanie ohne und nach Ca-Behandlung.)

Von

Alexander Palladin und **Lydia Griliches.**

[Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des medizinischen Instituts (vorm. Universität) zu Charkow.]

(Eingegangen am 3. Februar 1924.)

In den letzten Jahren erschien eine Reihe interessanter Arbeiten über die Biochemie der verschiedenen Tetanieformen. Es war schon längst bekannt, daß die bei der Tetanie der Kinder und Erwachsenen beobachteten Symptome eine große Ähnlichkeit mit denjenigen Erscheinungen haben, die nach der Entfernung der Nebenschilddrüsen und nach der Einspritzung von Guanidin beobachtet werden. Dieser Umstand legte die Annahme nahe, daß die Ursache dieser Symptome die gleiche sei. Die in den letzten Jahren erschienenen Arbeiten versuchen, eine derartige Annahme durch eine Reihe von Tatsachen über die Veränderung der chemischen Blutzusammensetzung bei den verschiedenen Tetanieformen zu begründen.

Nach den Untersuchungen von *de Waard, Kramer, György* u. a. sinkt bei der Kindertetanie der Ca-Gehalt im Blute und kehrt zur Norm zurück, sobald die Tetanieanfälle vorüber sind; nach den Untersuchungen von *Trendelenburg* und *Goebel* tritt hauptsächlich eine Verminderung des Gehaltes an ionisiertem Ca auf. Eine ebensolche Herabsetzung des Ca-Gehaltes im Blute fanden *Hastings* und *Murray* bei der parathyreopriven, *Watanabe, Bayer, György* und *Vollmer* bei der Guanidintetanie: *Nelken* dagegen hat nach Guanidinintoxikation den Ca-Gehalt des Blutes nicht vermindert, sondern vermehrt gefunden.

Nach *Elias* und *Spiegel* sind die verschiedenen Tetanieformen der Erwachsenen von einer starken Erhöhung des Blutgehaltes an anorganischem Phosphor begleitet. Bei der Kindertetanie wird eine derartige Steigerung nicht beobachtet, jedoch findet nach den Untersuchungen von *György* ein Sinken des Phosphorgehaltes im Blute nach dem Aufhören der Tetanie statt. Ebenso, d. h. im Sinne einer Steigerung des anorganischen Phosphatgehaltes im Blute, wirken die parathyreoprive Tetanie (*Hastings* und *Murray*) und die Guanidintetanie (*Watanabe* und *György*). Alle drei Tetanieformen rufen sogar eine Hypoglykämie hervor (*Petenyi* und *Lax, Underhill* und *Nullans, Watanabe*).

Die meisten der letzten Untersuchungen, die sich mit der Aufklärung des Einflusses der Tetanie auf das Gleichgewicht der Säuren und Basen im Organismus beschäftigen, weisen darauf hin, daß alle drei Tetanieformen den Stoffwechsel im Sinne einer Alkalosis verändern.

Alle diese Tatsachen sprechen dafür, daß die verschiedenen Tetanieformen biochemisch viel Gemeinsames haben, ein Umstand, der an eine gemeinsame Pathogenese sowohl der Tetanie bei Kindern und Erwachsenen, als auch der beiden oben genannten Formen der experimentellen Tetanie denken läßt.

Wir dürfen daher annehmen, daß die weiteren Untersuchungen auf dem Gebiete der Biochemie der experimentellen Tetanie, indem sie uns den Mechanismus der bei ihr entstehenden Stoffwechselstörung aufklären, zugleich auch die Ätiologie und den Mechanismus derjenigen Erscheinungen uns klarmachen werden, die bei den verschiedenen Formen der Tetanie der Kinder und Erwachsenen beobachtet werden.

Seitdem im Harne tetaniekranker Kinder eine Erhöhung des Guanidingehaltes gefunden wurde und seitdem festgestellt war, daß auch bei Hunden nach einer Parathyreoidektomie eine solche Erhöhung des Guanidingehaltes im Blute und im Harne stattfindet, begann man, dem Guanidin eine bestimmte Rolle in der Ätiologie der Tetanie zuzuschreiben, ja es wurde sogar als *Tetaniegift* angesehen. Eine solche Annahme ist um so wahrscheinlicher, als auch nach Einspritzung von Guanidin Krämpfe und andere Erscheinungen beobachtet werden, die mit denjenigen bei der Tetanie vollkommen identisch sind. *Burns* und *Sharpe* fanden in 100 ccm Harn normaler Kinder 0,12 mg und im Harne tetaniekranker Kinder 0,58 mg Guanidin. Eine ebensolche Steigerung der Guanidinausscheidung im Harne fanden *Findley* und *Sharpe* bei der idiopathischen Tetanie des Erwachsenen. *Sharpe* fand eine das Normale weit übertreffende Menge von Guanidin in den Fäzes tetaniekranker Kinder.

Das Auftreten gleichartiger nervöser Symptome bei der Kinder- und parathyreopriven Tetanie, sowie bei der Vergiftung mit Guanidin, gleichartige Veränderungen in den Prozessen des Stoffwechsels in allen drei Fällen, all das veranlaßt uns, *das Guanidin als ein Tetaniegift anzusehen* und die Anhäufung von Guanidin bei der Tetanie mit der Funktionsstörung der Nebenschilddrüsen in Verbindung zu bringen. *Noel Paton* und *Findley* nehmen an, daß die Nebenschilddrüsen den Guanidinstoffwechsel regeln; bei Störung ihrer Funktion oder Entfernung derselben häufen sich große Mengen von Guanidin an, die nun Tetaniekrämpfe hervorrufen.

Eine solche Anschauung von der Rolle des Guanidins bei der Tetanie führte zu den Untersuchungen, die sich damit beschäftigten, um festzustellen, in welcher Weise die verschiedenen Tetanieformen

auf den Kreatinstoffwechsel einwirken, da einerseits zweifelsohne ein Zusammenhang zwischen dem Muskeltonus und dem Kreatinstoffwechsel besteht, andererseits ein Zusammenhang zwischen dem Guanidin und Kreatin durchaus möglich ist.

Es existieren einige Arbeiten, die der Aufklärung dieser Frage gewidmet sind. *Wishart* fand, daß nach einer Guanidineinspritzung (subkutan oder intravenös) der Kreatingehalt in den Muskeln ansteigt. *Burns*, der die Kreatininausscheidung bei hungernden, mit Guanidin vergifteten Hunden untersuchte, fand das Kreatinin in zwei Fällen herabgesetzt, in einem (1) Falle gesteigert. *Henderson* fand bei parathyreoidektomierten Hunden und Katzen den Kreatingehalt in den Muskeln erhöht. *Burns* fand, daß nach Entfernung der Schilddrüse und Nebenschilddrüsen die Kreatininausscheidung herabgesetzt ist, und daß bei einigen Hunden eine geringe Menge von Kreatin auftritt. *Greenwald* und *Cooke* fanden bei der akuten Tetanie eine mäßige Kreatininerhöhung im Harne, *Greenwald* dagegen beobachtete in einem analogen Falle eine Herabsetzung des Harnkreatinins und Vermehrung des Kreatins.

Man sieht also, daß die Ergebnisse der angeführten Untersuchungen widersprechend sind. Diese Versuche machen den Eindruck, als ob die verschiedenen Tetanieformen den Kreatinstoffwechsel nicht in gleicher Weise beeinflussen, was jedoch den oben angeführten Tatsachen über den Einfluß der Tetanie auf Ca, P und Zucker im Blute widerspricht. Ferner widerspricht eine gleichzeitige Erhöhung des Kreatingehaltes in den Muskeln und Herabsetzung der Kreatininausscheidung im Harne, ohne Auftreten von Kreatin, unseren Kenntnissen von dem Zusammenhang zwischen Muskelkreatin einerseits und Harnkreatinin und -kreatin andererseits. Alles das macht ein weiteres Studium des Kreatinstoffwechsels bei der experimentellen Tetanie zwecks Aufklärung der angeführten Widersprüche notwendig.

Ein solches Studium war der Zweck unserer Untersuchungen, die außerdem noch deshalb notwendig waren, weil in den angeführten Versuchen von *Burns* das Bild durch Hungern und gleichzeitige Entfernung der Schilddrüse beider Versuchsobjekte kompliziert wurde. Wir stellten Versuche über den Einfluß der Guanidintetanie bei Kaninchen und jungen Hunden und der parathyreopriven Tetanie bei jungen Hunden auf die Kreatinin- und Kreatinausscheidung im Harne und auf den Kreatingehalt in den Muskeln an. Zwecks Hervorrufung einer Guanidintetanie wurde den Kaninchen eine Lösung von *kohlensaurem oder salzsaurem Guanidin* eingespritzt.

Die Kreatin- und Kreatininbestimmung im Harn wurde nach der Methode *Folin* und *Morris* ausgeführt. Der Gehalt des Gesamtstickstoffs im Harn wurde nach der kolorimetrischen Methode *Folin-Farmer-Gulick* bestimmt. Der Kreatingehalt in den Muskeln wurde nach der *Riesser*schen, von *A. Palladin* etwas modifizierten[1]) Methode bestimmt. Die Kaninchen

[1]) *Alexander Palladin* und *A. Kudriawzeff*, diese Zeitschr. **133**, 89, 1922.

und jungen Hunde befanden sich während der ganzen Versuchszeit in zum Studium des Stoffwechsels bestimmten Käfigen, die Kaninchen wurden mit Hafer und Rüben, die jungen Hunde mit Milch und Weißbrot gefüttert.

Für die Versuche mit parathyreopriver Tetanie nahmen wir junge Hunde, wobei stets von einem jungen Hundepaar ein und desselben Wurfes der eine zur Kontrolle diente und uns die Zahlen einer normalen Stickstoff-, Kreatinin- und Kreatinausscheidung angab, während der andere, nachdem festgestellt war, daß er Stickstoff, Kreatinin und Kreatin in normaler Menge ausscheide, einer Operation zwecks Entfernung sämtlicher Nebenschilddrüsen unterzogen wurde, worauf die Beobachtungen über die Ausscheidung von Kreatinin, Kreatin und dem Gesamtstickstoff fortgesetzt wurden.

Die Versuche zeigten, daß *sowohl die Guanidintetanie als auch die parathyreoprive Tetanie in vollkommen gleicher Weise die Kreatinin- und Kreatinausscheidung beeinflussen*, und zwar *war das Auftreten von Tetaniesymptomen* in beiden Fällen *von einem Erscheinen von Kreatin im Harne* (bei den Kaninchen) *oder von einer starken Erhöhung der Kreatinausscheidung* (bei den jungen Hunden) *und von einer bedeutend geringeren Erhöhung der Kreatininausscheidung begleitet*. Zur Illustration des Gesagten werden die Protokolle der zwei Versuche mit Guanidintetanie (Tabellen I und II) und des Versuches mit parathyreopriver Tetanie (Tabelle III) angeführt.

Tabelle I.

Kaninchen Nr. 4, männlich. Kreatinausscheidung bei Guanidintetanie.

Datum	Gewicht des Kaninchens g	Gesamt-N im Harn g	Kreatinin-N mg	Kreatinin-N in Proz. des Gesamt-N	Kreatin-N	Wieviel Guanidin war eingespritzt?
1923						
1./2. III.	1950	2,30	0,074	—	—	
3./4. III.	1950	1,58	0,055	3,6	—	5. III. —0,24 g
5./6. III.	1760	2,56	0,098	3,9	0,015	6. III. —0,24 g
7./8. III.	1570	1,25	0,057	4,5	0,017	7. III. —0,08 g

Vom 6. III. Tetanieanfälle. 8. III. um 1h abgetötet, währenddem kräftige Tetanieanfälle.

Tabelle II. Kaninchen Nr. 7, männlich. Guanidintetanie.

Datum	Urinmenge ccm	Gewicht des Kaninchens g	Gesamt-N g	Kreatinin-N mg	Kreatinin-N in Proz. des Gesamt-N	Kreatin-N	Wieviel Guanidin war eingespritzt?
1923							
1./2. V.	145	2020	2,08	0,064	3,0	—	
3./4. V.	245	2020	2,38	0,082	3,5	—	4. V. — 0,32 g 5. V. — 0,24 g
5./6. V.	270	1800	1,11	0,067	6,0	0,015	6. V. — 0,20 g 7. V. — 0,24 g
7./8. V.	180	1600	1,09	0,047	4,0	0,043	

Vom 5. V. kräftige Tetanieanfälle. 8. V. getötet.

Tabelle III.

Junger, zweimonatiger Hund Nr. 5. Parathyreoprive Tetanie.

Datum	Gewicht des Hundes g	Gesamt-N mg	Kreatinin-N	Kreatin-N	
7. III.	1770	1,041	0,026	0,020	
8. III.	1780	1,020	0,022	0,023	
9. III.	1782	1,050	0,030	0,020	
10. III.	1785	1,045	0,024	0,028	*Operation*
11. III.	1780	1,030	0,025	0,025	
12. III.	1765	1,025	0,030	0,036	Tetanieanfälle
13. III.	1755	1,010	0,028	0,045	"
14. III.	1740	1,000	0,025	0,050	"
15. III.	1725	0,987	0,020	0,060	Kräftige Tetanie
16. III.	—	—	—	—	tot

Um den Einfluß der experimentellen Tetanie auf den *Kreatinstoffwechsel in den Muskeln* klarzustellen, wurden die Versuchstiere in dem Augenblick getötet, als die Tetanieanfälle ihre höchste Entwicklung erreicht hatten und die Tiere zum Exitus zu bringen drohten; unverzüglich wurden die Extremitätenmuskeln abpräpariert und ihr Gehalt an Kreatin bestimmt.

Die Muskeln der normalen Kontrollkaninchen enthielten 0,525 Proz. Kreatin. In den Muskeln der mit Guanidin vergifteten Kaninchen war der Kreatingehalt stets bedeutend größer, wobei seine Mengen um so größer waren, je größere Guanidindosen dem Kaninchen eingespritzt worden und je stärker also die Tetanieanfälle waren.

In der Tabelle IV sind die Ergebnisse der hierher gehörenden Versuche angeführt.

Tabelle IV.

Muskelkreatin bei der Guanidintetanie.

Nummer der Versuchskaninchen	Kreatingehalt in den Muskeln Proz.	Menge des eingespritzten Guanidincarbonats
1	0,525	Kontrollkaninchen
2	0,666	1,78 g während 10 Tagen
4	0,641	0,56 g " 3 "
5	0,681	0,88 g " 3 "
6	0,580	0,70 g " 4 "

Dasselbe haben wir auch bei jungen Hunden nach Parathyreoidektomie bekommen. *Parathyreoprive Tetanie ruft bei Hunden eine Erhöhung des Kreatingehaltes in den Muskeln hervor.* Als Beispiel führe ich hier zwei Protokolle derartiger Versuche an (Tabelle V).

Wir sehen also, daß die *experimentelle Tetanie von einem erhöhten Kreatingehalt in den Muskeln und von einer erhöhten Kreatininausscheidung begleitet ist bei gleichzeitigem Auftreten von Kreatin im Harne.*

Tabelle V.
Muskelkreatin nach Parathyreoidektomie.

	Nummer des jungen Hundes	Kreatingehalt in den Muskeln Proz.	
Erstes Paar .	1	0,384	Kontrollhund
	2	0,426	Parathyreoprive Tetanie
Zweites Paar	3	0,372	Kontrollhund
	4	0,418	Parathyreoprive Tetanie

Hier wie auch in anderen Fällen von Kreatinurie ist diese als Folge eines erhöhten Kreatingehaltes in den Muskeln anzusehen.

Wodurch wird nun diese Steigerung des Kreatingehaltes in den Muskeln bei der experimentellen Tetanie hervorgerufen? *Noel Paton* nimmt an, daß wir es hier mit einem Unschädlichkeitsmachungsprozeß des Guanidins zu tun haben und daß also der Kreatingehalt in den Muskeln bei Tetanie deshalb erhöht ist, weil *das bei der Tetanie im Überschuß sich bildende Guanidin zwecks seiner Unschädlichkeitsmachung in den Muskeln in Kreatin sich umsetzt.*

Es ist jedoch auch eine andere Erklärung möglich, die uns viel wahrscheinlicher scheint: Man kann annehmen, daß *die Kreatinanhäufung in den Muskeln bei Tetanie das Resultat derjenigen Vorgänge ist, die mit den tonischen Muskelkrämpfen bei den Tetaniesymptomen in Zusammenhang stehen.*

Zur Prüfung der Richtigkeit unserer Annahmen wurden weitere Versuche angestellt, die von folgenden Überlegungen ausgingen.

Bei allen Tetanieformen findet, wie wir gesehen haben, eine relative Verminderung des Ca-Gehaltes (Ca-Ionen) im Blute statt; dies ruft eine Verarmung des Nervengewebes an Ca hervor, dessen Reizbarkeit erhöht wird. Wenn man annimmt, daß die Tetanie mit einer Funktionsstörung der Nebenschilddrüsen, die den Guanidinstoffwechsel regeln, in Zusammenhang steht, so häuft sich im Organismus nach Entfernung dieser Drüsen oder bei einer Störung ihrer normalen Tätigkeit ein Überschuß von Guanidin auf, der die Fähigkeit der Zellen, Ca zu binden, herabsetzt und somit eine Verarmung an letzterem im Nervengewebe bedingt. Die Zufuhr von Ca bei Tetanie müßte, indem sie die Erregbarkeit des Nervengewebes herabsetzt, die Tetanieanfälle abschwächen oder ganz beseitigen. Und in der Tat sehen wir, daß die subkutane oder intravenöse Injektion von Ca die Tetanie bei Menschen und die experimentelle parathyreoprive Tetanie zur Heilung bringt.

Wenn die Guanidintetanie ihrer Pathogenese nach den anderen Tetanieformen gleichbedeutend ist, so muß auch bei ihr die Zufuhr von Ca die Krämpfe beseitigen. Zugleich muß, wenn *Noel Paton* recht hat, daß der erhöhte Kreatingehalt in den Muskeln durch Unschädlich-

machung des Guanidins bedingt wird, bei der Guanidintetanie auch nach der Einspritzung von Ca - Salzen der Kreatingehalt in den Muskeln gleich hoch bleiben. *Wenn jedoch unsere Annahme richtig ist, so wird das Ca*, indem es die Tetaniesymptome beseitigt, *zugleich auch die Ursache der verstärkten Kreatinbildung beseitigen*, infolgedessen der Kreatingehalt in den Muskeln normal bleiben wird.

Zur Aufklärung dieser Frage wurde einer Reihe von Kaninchen gleichzeitig mit der Einspritzung von Guanidin, Calcium chloratum oder Calcium carbonicum subkutan injiziert.

Die Versuche zeigten vor allem, *daß bei gleichzeitiger Einspritzung von Guanidin und ausreichenden Ca-Dosen bei den Kaninchen keine Tetaniesymptome auftraten.*

Wenn jedoch zunächst Guanidin allein eingespritzt wurde und als Folge davon Krämpfe begannen, so konnte man durch eine folgende Einspritzung von Ca diese Symptome abschwächen oder sogar zur Heilung bringen. *Bei der Einspritzung von Ca blieb die Kreatininausscheidung fast in normalen Grenzen, während Kreatin entweder überhaupt nicht oder in bedeutend geringeren Mengen auftrat* (natürlich nur in dem Falle, wenn die Ca-Injektion die Krämpfe beseitigt hatte).

Zur Aufklärung der *Einwirkung des Ca auf den Kreatingehalt in den Muskeln* wurden die Versuche so angestellt, daß einem Kaninchenpaare völlig gleiche Guanidindosen (unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts) eingespritzt wurden. Einem dieser Kaninchen wurde außerdem Ca eingespritzt. Alsdann wurden, nachdem die Tetanieanfälle bei demjenigen Kaninchen, das nur Guanidin bekommen hatte, ihren Höhepunkt erreicht hatten, beide Kaninchen getötet und der Kreatingehalt in ihren Muskeln gleichzeitig bestimmt.

Die Versuche zeigten, daß *in den Muskeln der mit Ca behandelten Guanidinkaninchen stets bedeutend weniger Kreatin gefunden wurde als in den Muskeln derjenigen Kaninchen, denen nur Guanidin allein eingespritzt worden war.* Wenn Ca in ausreichenden Mengen eingespritzt worden war, so daß überhaupt keine Krämpfe auftraten und die Kreatininausscheidung fast gar nicht gestört wurde, so stellte sich der Kreatingehalt in den Muskeln als vollständig normal heraus.

In der Tabelle VI sind die Resultate solcher Versuche angeführt.

Wir sehen also, daß *trotz der Guanidineinspritzung der Kreatingehalt in den Muskeln normal bleibt, wenn mittels Ca die Tetaniesymptome beseitigt werden.* Wir dürfen daher den erhöhten Kreatingehalt in den Muskeln bei Tetanie keineswegs damit erklären, daß er aus dem eingespritzten oder aus dem bei der Parathyreoidektomie in Überschuß sich bildenden Guanidin entstehe.

Bei der Tetanie findet sich deshalb so viel Kreatin in den Muskeln, weil die Tetanieanfälle einen verstärkten Zerfall des Muskeleiweißes

Tabelle VI.

Kreatingehalt in den Muskeln der Guanidinkaninchen ohne und nach Ca-Behandlung.

Kaninchen		Einspritzung von	Kreatingehalt in den Muskeln Proz.
Erstes Paar .	a	Guanidin (0,6 g in 5 Tagen)	0,641
	b	„ + Calcium (0,35 g)	0,580
Zweites Paar	a	„ (0,88 g in 3 Tagen)	0,682
	b	„ + Calcium (0,55 g)	0,552
Drittes Paar	a	„ (0,7 g in 4 Tagen)	0,580
	b	„ + Calcium (1,15 g)	0,530
Viertes Paar .	a	„ (0,8 g in 4 Tagen)	0,595
	b	„ + Calcium (1,20 g)	0,522

bei verstärkter Kreatinbildung zur Folge haben. Calcium läßt, indem es die Erregbarkeit des Nervengewebes herabsetzt, den normalen Muskelzustand unbeeinflußt, wobei auch diejenigen Vorgänge, die mit der Kreatinbildung in Zusammenhang stehen, in normalen Grenzen bleiben. Calcium beseitigt nicht nur die sichtbaren Tetaniesymptome, sondern schützt auch das Muskelgewebe vor Zerfall.

Zusammenfassung.

1. Bei der Guanidintetanie und parathyreopriven Tetanie sind in den Muskeln infolge ihrer Zustandsveränderung die Vorgänge der Kreatinbildung gesteigert.

2. Der erhöhte Kreatingehalt in den Muskeln bei experimenteller Tetanie hat das Auftreten von Kreatin im Harne zur Folge, wobei die Kreatininausscheidung entweder leicht erhöht ist oder fast unverändert bleibt.

3. Bei der experimentellen Tetanie besteht somit ein direkter Zusammenhang zwischen der Kreatinbildung in den Muskeln und der Kreatin- und Kreatininausscheidung im Harne.

4. Bei der Einspritzung von Ca blieb bei Guanidinkaninchen die Kreatinausscheidung fast in normalen Grenzen, während Kreatin entweder überhaupt nicht oder in bedeutend geringeren Mengen auftrat.

5. Bei Guanidintetanie bleibt der Kreatingehalt in den Muskeln normal, wenn mittels Ca die Tetaniesymptome beseitigt werden.

6. Der erhöhte Kreatingehalt in den Muskeln bei experimenteller Tetanie ist nicht, wie es *Noel Paton* meint, die Folge einer Bildung von überschüssigen Mengen desselben aus Guanidin, da ja bei Calciumzufuhr der Kreatingehalt in den Muskeln ceteris paribus vollständig normal bleibt.

Literatur.

Trendelenburg, Ber. d. ges. Physiol. **2**, 163, 1920; — *Hastings* und *Murray*, Journ. of Biol. Chem. **46**, 233, 1921. — *Watanabe*, ebendaselbst **33**, 253, 1917/18; **34**, 1918; **36**, 531, 1918. — *György* und *Vollmer*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1922. — *Nelken*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 261. — *Elias*, Deutsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1236. — *Underhill*, Journ. of Biol. Chem. **18**, 87, 1914. — *Burns* and *Sharpe*, Quart. Journ. of Physiol. **10**, 345, 1917. — *Findlay* and *Sharpe*, Quart. Journ. of Med. **13**, 1920. — *Sharpe*, Biochem. Journ. **14**, 46, 1920. — *Noel Paton*, Quart. Journ. of Physiol. **10**, 1916. — *Wishart*, Journ. of Physiol. **53**, 440, 1920; — *Burns*, Quart. Journ. of Physiol. **10**, 361, 1917. — *Henderson*, Journ. of Physiol. **52**, 1, 1918. — *Greenwald*, Amer. Journ. Physiol. **28**, 1911; diese Zeitschr. **54**, 159, 1913; Journ. of Biol. Chem. **25**, 223, 1917. — *Cooke*, Journ. f. exper. Med. **13**, 439, 1911. — *Folin* and *Farmer*, Journ. of Biol. Chem. **11**, 495, 1919. — *Gulick*, ebendaselbst 18, 541, 1914. — *Folin* und *Morris*, ebendaselbst **17**, 469, 1914. — *Riesser*, Hoppe-Seylers Zeitschr. **86**, 415, 1913.

Über die Möglichkeit, die Veränderungen, die in Gemischen organischer Farbstofflösungen vor sich gehen, auf dem Wege der Spektrophotometrie zu verfolgen.

Von

Margarete v. Havas.

(Aus dem physiologisch-chemischen Instiut der k. ungarischen Universität Budapest.)

(Eingegangen am 11. Februar 1924.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Der Vorschlag von *Vierordt* und später von *Hüfner*, die Konzentration zweier in einer Blutlösung nebeneinander enthaltener Blutfarbstoffe aus dem Extinktionskoeffizienten der Lösung an zwei Spektralstellen und aus dem bekannten Absorptionsverhältnis jedes der beiden Farbstoffe an denselben Spektralstellen zu berechnen, ließe sich wohl auch auf andere Farbstoffe, namentlich auf solche anwenden, die in tierischen Flüssigkeiten, Sekreten vorkommen; natürlich immer vorausgesetzt, daß die beiden Farbstoffe in der Lösung nebeneinander unverändert vorhanden sind, d. h. aufeinander nicht in dem Sinne einwirken, daß hierbei eine neue Verbindung entsteht. Nun sind aber unsere Kenntnisse sogar über die am gewöhnlichsten vorkommenden tierischen Farbstoffe (die Blutfarbstoffe ausgenommen) recht dürftige, und wir sind weit davon entfernt, darüber etwas aussagen zu können, wie sich so ein Paar von tierischen Farbstoffen bei gleichzeitiger Anwesenheit in einer Lösung zueinander verhält.

Ein vielleicht gangbarer Weg, diese Frage zu beantworten, ist derjenige, der in den nachfolgend beschriebenen Versuchen eingeschlagen wurde, welche Versuche sich allerdings nicht auf tierische, sondern auf leicht zugängliche und auch ihrer chemischen Natur nach gut gekannte Farbstoffe der chemischen Fabrikation beziehen. Die Resultate, die aus diesen Versuchen hervorgehen, werden sich hoffentlich früher oder später in dem eingangs erwähnten Sinne verwenden lassen.

Es bereitet wohl zumeist Schwierigkeiten, mittels der für gewöhnlich verwendeten chemischen Methoden festzustellen, ob wenig reaktionsfähige Körper von bedeutender Molekulargröße, wie es die

in der Regel kolloiden organischen Farbstoffe sind, aufeinander einwirken oder nicht, d. h. ob in dem Gemische ihrer Lösungen neue Verbindungen entstehen, oder aber die beiden Komponenten auch weiterhin unverändert nebeneinander bestehen? Es erschien mir aussichtsvoll, die Lösung dieser Frage auf dem Wege der Spektrophotometrie zu versuchen, und zwar ging ich dabei von folgendem Gedankengange aus. Wird die Lichtabsorption zweier in Wasser gelöster Farbstoffe A und B zunächst *gesondert*, sodann die Lichtabsorption des *Gemisches* beider Lösungen bestimmt, so ergeben sich die folgenden Möglichkeiten:

a) Erhält man für die Lichtabsorption des Gemisches Werte, die sich von den aus beiden Komponenten zu berechnenden Werten nicht mehr unterscheiden, als den zulässigen Versuchsfehlern entspricht, so weist dies darauf hin, daß die beiden Verbindungen aufeinander gegenseitig nicht eingewirkt haben.

b) Ist hingegen der Unterschied zwischen gefundenen und berechneten Werten größer, so kann man voraussetzen, daß die beiden Komponenten aufeinander chemisch oder anderswie (gegenseitige Adsorption) eingewirkt hatten.

Methodik.

Die Lichtabsorption je einer Lösung bzw. eines Lösungsgemisches wurde längs einer möglichst langen Strecke des sichtbaren Spektrums mittels eines von *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *König*schen Spektrophotometers (große Beleuchtungsvorrichtung) bestimmt, dessen Orientierungsskala vorangehend durch Bestimmung an 42 Stellen geeicht ward. Da sich homogenes Licht von hinreichender Intensität und Konstanz bloß an wenigen Spektralstellen herstellen läßt, ich aber die Ablesungen an mehreren Stellen des Spektrums ausführen wollte, mußte ich wohl oder übel gemischtes Licht (mittels einer Metallfadenglühlampe erzeugt) verwenden, konnte aber dadurch, daß ich den Okularspalt recht enge nahm, erreichen, daß die Wellenlängen an je einer Spektralstelle nicht allzu beträchtlich voneinander abwichen, und zwar gegen das rote Spektralende zu um etwa 15, gegen das blaue Ende zu um etwa 5 $\mu\mu$ in maximo.

Zur Untersuchung kamen bloß Farbstoffe, die:

a) in Wasser, wenn auch bloß nach der Art von Kolloiden, leicht löslich waren (ausnahmsweise mußte zum Lösungsprozesse etwas Alkohol zu Hilfe genommen werden);

b) deren verdünnte Lösungen auch bei größerer Schichtdicke kristallklar durchsichtig waren, so daß eine Lichtablenkung durch gröber dispergierte Teilchen so gut wie ausgeschlossen werden konnte;

c) deren Lösung recht scharfe Absorptionsstreifen aufweisen; diese durften jedoch nicht allzu nahe zum roten oder violetten Spektralende gelegen sein, wo die spektrophotometrische Bestimmung erfahrungsgemäß weit schwieriger ist, als die einfache Spektroskopie;

d) auch mußten die Farbstoffpaare so zusammengestellt sein, daß die Absorptionsstreifen der Komponenten voneinander möglichst entfernt

seien, denn nur in diesem Falle war eine Feststellung etwaiger Gesetzmäßigkeiten zu erhoffen.

Aus diesen Gesichtspunkten haben sich unter den mir zur Verfügung stehenden Farbstoffen die folgenden als verwendbar erwiesen: Fuchsin, Methylenblau, Malachitgrün, Säureviolett, Eosin und Türkischblau. Von jedem dieser Farbstoffe wurden wässerige Stammlösungen (von Eosin mit Hilfe einer entsprechenden Menge von Alkohol) hergestellt, die dann, 50- bzw. 100fach verdünnt, zur spektrophotometrischen Prüfung geeignet waren. Um Lösungen von genau bekannter Konzentration zu erhalten, wäre es natürlich am einfachsten gewesen, bekannte Mengen der Farbstoffe in bekannten Mengen Wassers zu lösen. Nun enthielten aber die mir zur Verfügung stehenden Präparate in der Regel einen unlöslichen Rest, so daß die Konzentration nur durch Trockensubstanzbestimmung in den klaren Filtraten ermittelt werden konnte. Da es sich aber stets um sehr verdünnte Lösungen gehandelt hatte und von diesen große Mengen eingedampft werden mußten, die dann einen relativ geringen Rückstand hinterließen, ist es begreiflich, daß die Konzentrationsbestimmungen keinen Anspruch auf größere Genauigkeit erheben können. Die Lichtabsorption je einer Lösung bzw. je eines Lösungsgemisches wurde längs des sichtbaren Spektrums festgestellt, und zwar in der Gegend der Absorptionsmaxima in engeren, darüber hinaus in weiteren Intervallen. Bezüglich des Verhaltens der Lösungsgemische waren von vornherein zwei Möglichkeiten zu erwarten, nämlich, daß *zwei quoad ihres Säure- bzw. Basencharakters gleichartige Farbstoffe im Gemische ihrer Lösungen aufeinander nicht, verschiedenartige jedoch wohl einwirken.* Im ersteren Falle mußte es zu einer Summation der Lichtabsorption der Komponenten kommen, und zwar mußte, da gleiche Volumina der beiden Komponentenlösungen vermischt wurden, die „gefundene" Lichtabsorption an jeder Spektralstelle gleich sein der Hälfte der Summe der Lichtabsorption der beiden Komponenten („berechnete" Lichtabsorption). War hingegen zwischen „gefundener" und „berechneter" Lichtabsorption ein erheblicherer Unterschied zu konstatieren, so war anzunehmen, daß die beiden Farbstoffe aufeinander eingewirkt haben, aus ihnen eventuell ein neuer Farbstoff entstanden ist.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen, die ich ausgeführt hatte, seien nachfolgend mitgeteilt; vor allem sei jedoch folgendes vorausgeschickt. In den Tabellen ist, da ich gemischtes Licht verwenden mußte, in der mit „Spektralstelle" überschriebenen Kolumne die Wellenlänge der Strahlen angegeben, die die Mitte des durch den Okularspalt begrenzten Spektralausschnittes einnehmen; ferner auch, daß an Spektralstellen, wo die eine oder die andere der beiden Komponenten bloß eine sehr geringe Lichtabsorption aufweist, diese bei der Berechnung vernachlässigt wurde.

I.

Versuchsreihe 1. Fuchsin und Malachitgrün.

Von einer 0,0345proz. Fuchsin-Stammlösung und einer 0,709proz. Malachitgrün-Stammlösung wurden je 10 ccm vermischt und dieses Gemisch auf ein Liter verdünnt. Die Extinktionskoeffizienten jeder

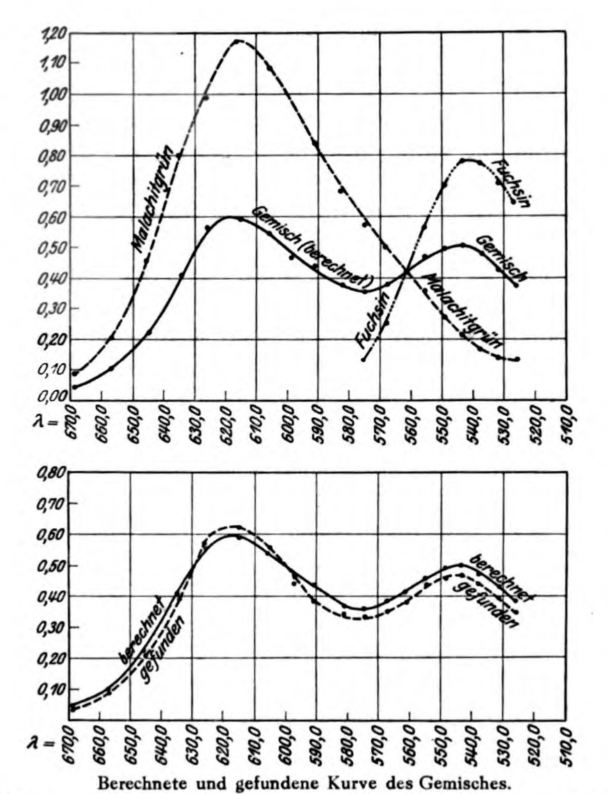
Farbstofflösung, wie auch die gefundenen und berechneten Extinktionskoeffizienten des Gemisches sind in Tabelle I mitgeteilt[1]). Daselbst ist auch in der letzten Kolumne der Unterschied zwischen dem gefundenen und berechneten Werte in Prozenten berechnet.

Tabelle I.

Spektralstelle $\mu\mu$	ε in der Fuchsinlösung	ε in der Malachitgrünlösung	ε im Fuchsin-Malachitgrüngemisch		Unterschied in Proz. des berechneten Wertes
			gefunden	berechnet	
669,5	—	0,0884	0,0425	0,0442	—4
657,2	—	0,209	0,104	0,105	—1/2
645,9	—	0,458	0,224	0,229	—2
635,4	—	0,802	0,394	0,402	—2
625,5	—	1,11	0,560	0,558	+1
615,9	—	1,17	0,626	0,587	+7
606,7	—	1,08	0,568	0,548	+4
598,3	—	0,875	0,463	0,449	+3
590,3	—	0,834	0,389	0,436	—9
582,5	—	0,683	0,343	0,388	—11
575,5	0,149	0,580	0,332	0,364	—8
568,5	0,256	0,506	0,352	0,381	—7
561,5	0,402	4,17	0,387	0,410	—6
555,2	0,563	0,360	0,432	0,461	—7
549,2	0,692	0,277	0,459	0,458	±0
543,1	0,778	0,220	0,468	0,499	—6
537,4	0,772	0,178	0,440	0,475	—8
527,0	0,641	0,132	0,346	0,386	—10

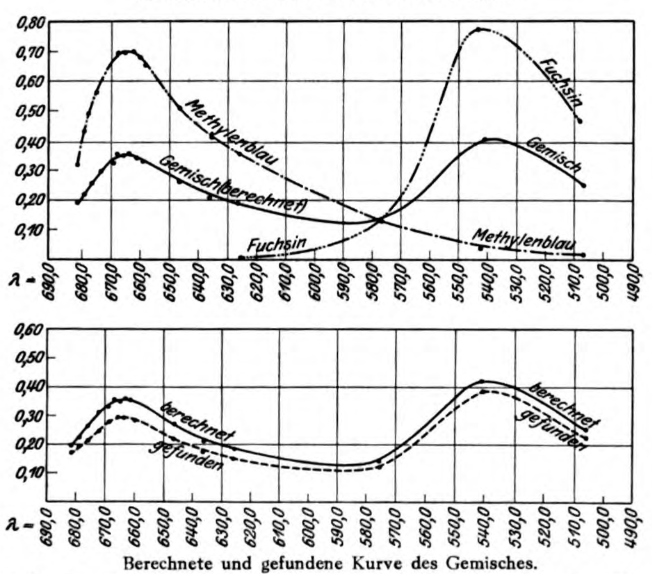
Wie den Daten der Tabelle I, besonders aber der Abb. 1 zu entnehmen ist, stimmen die am Gemische gefundenen Extinktionskoeffizienten mit den aus den Komponenten berechneten an vielen Spektralstellen gut überein; aber auch an den übrigen Stellen beträgt der Unterschied nicht mehr als 6 bis 7 Proz., und bloß an einer Stelle 11 Proz. Wir können also mit Recht schließen, daß die beiden Farbstoffe im Gemisch ihrer Lösungen aufeinander *nicht* eingewirkt hatten, wie ja dies von vornherein auch daraus gefolgert werden konnte, daß sie beide basischen Charakter haben.

[1]) In den weiter unten zu behandelnden Versuchsreihen habe ich die Gemische aus gleichen Volumina der vorher verdünnten Stammlösungen hergestellt, also nicht wie in dieser ersten Versuchsreihe, erst die Stammlösungen vermischt und dann (auf 1 Liter) verdünnt. Der Einheitlichkeit und der besseren Übersicht halber habe ich aber auch die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe so berechnet, wie die der übrigen, also alle Extinktionskoeffizienten, die gefundenen sowohl wie auch die berechneten, auf die Hälfte reduziert.



Berechnete und gefundene Kurve des Gemisches.

Abb. 1. *Fuchsin und Malachitgrün.* Kurven der beiden Komponenten und aus diesen berechnete Kurve des Gemisches.



Berechnete und gefundene Kurve des Gemisches.

Abb. 2. *Fuchsin und Methylenblau.* Kurven der beiden Komponenten und aus diesen berechnete Kurve des Gemisches.

Versuchsreihe 2. Fuchsin und Methylenblau.

Die 0,0345proz. Fuchsin-Stammlösung und eine 0,0384proz. Methylenblau-Stammlösung wurden je 100mal verdünnt und gleiche Volumina dieser Verdünnungen vermischt. Aus den Ergebnissen der spektrophotometrischen Prüfung, die in der Tabelle II und der Abb. 2 mitgeteilt sind, geht hervor, daß die gefundenen Extinktionskoeffizienten stets, und zwar meistens um etwa 20 Proz. höher sind als die berechneten. Diese Unterschiede sind weit größer, als daß sie den zulässigen Ablesungsfehlern zugeschrieben werden könnten; andererseits deutet aber der Umstand, daß die Unterschiede sich längs des ganzen untersuchten Spektrums annähernd gleichmäßig hinziehen, eher auf einen Fehler in der Anfertigung der Verdünnungen als darauf hin, daß ein neuer Farbstoff entstanden wäre. Diese meine Annahme entspricht auch dem Umstande, daß beide Farbstoffe basischer Natur sind, daher aufeinander nicht eingewirkt hatten.

Tabelle II.

Spektralstelle $\mu\mu$	ε in der Fuchsinlösung	ε in der Methylenblaulösung	ε im Fuchsin-Methylenblaugemisch		Unterschied in Proz. des berechneten Wertes
			gefunden	berechnet	
681,9	—	0,367	0,160	0,183	— 12
679,4	—	0,432	0,182	0,216	— 17
676,9	—	0,496	0,209	0,248	— 19
674,5	—	0,565	0,234	0,283	— 24
669,5	—	0,651	0,272	0,326	— 17
666,8	0,001	0,698	0,282	0,349	— 22
664,4	—	0,684	0,285	0,342	— 19
662,0	—	0,696	0,282	0,348	— 22
659,6	—	0,675	0,278	0,338	— 20
657,2	—	0,656	0,272	0,328	— 16
645,9	0,001	0,515	0,217	0,258	— 20
635,4	—	0,412	0,170	0,207	— 21
625,5	0,003	0,363	0,149	0,183	— 21
575,5	0,149	0,122	0,118	0,135	— 14
541,8	0,781	0,0445 *)	0,371	0,412	— 11
507,8	0,469	0,0252	0,215	0,247	— 14

*) Dieser Extinktionskoeffizient wurde nicht bei 548,1, sondern bei 543,1 $\mu\mu$ bestimmt; doch konnte zwischen beiden Stellen kein wesentlicher Unterschied bestanden haben, daher auch der begangene Fehler bloß ein geringer war.

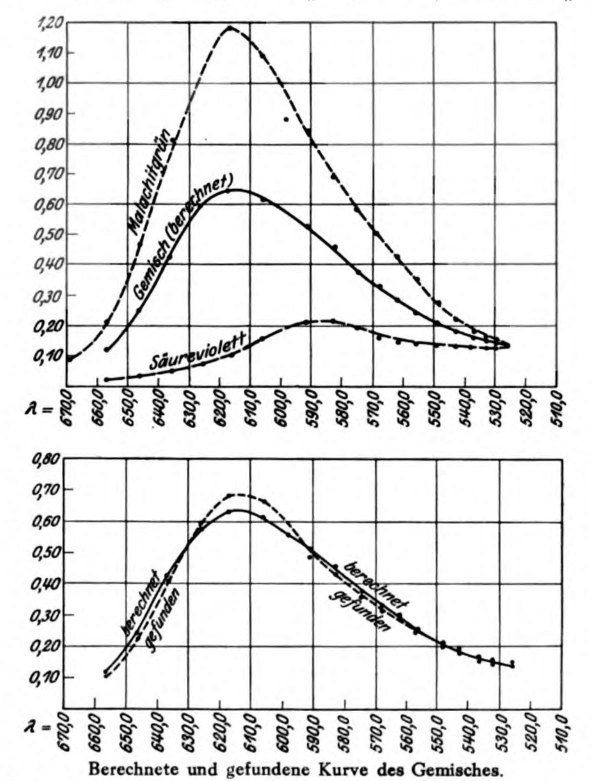
Versuchsreihe 3. Malachitgrün und Säureviolett.

Von der 0,0709proz. Malachitgrün-Stammlösung und von einer 0,1415proz. Säureviolett-Stammlösung wurden 100fache Verdünnungen hergestellt und von diesen verdünnten Lösungen gleiche Volumina vermischt. Die Ergebnisse der an diesem Gemisch ausgeführten Bestimmungen sind der Tabelle III und der Abb. 3 zu entnehmen.

In dieser Versuchsreihe wichen die gefundenen Extinktionskoeffizienten von den berechneten bloß um 7 Proz. in maximo ab,

Tabelle III.

Spektralstelle $\mu\mu$	ε in der Säureviolett-lösung	ε in der Malachitgrün-lösung	ε im Säureviolett-Malachitgrüngemisch gefunden	ε im Säureviolett-Malachitgrüngemisch berechnet	Unterschied in Proz. des berechneten Wertes
657,2	0,0209	0,209	0,113	0,115	— 2
645,9	0,0306	0,458	0,232	0,244	— 5
635,4	0,0432	0,802	0,408	0,423	— 4
625,5	0,0612	1,11	0,583	0,587	— 1
615,9	0,103	1,17	0,681	0,635	+ 7
606,7	0,151	1,08	0,665	0,617	+ 7
598,3	0,184	0,875	0,563	0,529	+ 6
590,3	0,202	0,834	0,485	0,519	— 8
582,5	0,205	0,683	0,425	0,444	— 5
575,5	0,187	0,580	0,371	0,383	— 3
568,5	0,165	0,506	0,323	0,336	— 4
561,5	0,147	0,417	0,295	0,282	+ 5
555,2	0,149	0,360	0,246	0,255	— 4
549,2	0,141	0,277	0,210	0,209	+ 1/2
543,1	0,138	0,220	0,182	0,179	+ 2
537,4	0,137	0,178	0,162	0,158	+ 3
532,2	0,136	0,163	0,157	0,149	+ 2
527,0	0,136	0,132	0,144	0,134	+ 7
516,9	0,138	0,0908	0,119	0,114	+ 5



Berechnete und gefundene Kurve des Gemisches.

Abb. 3. *Malachitgrün und Säureviolett.* Kurven der beiden Komponenten und aus diesen berechnete Kurve des Gemisches.

woraus wieder hervorgeht, daß auch diese Farbstoffe aufeinander *nicht* eingewirkt hatten, was aber um so auffallender ist, als ja hier Base und Säure einander gegenüberstehen.

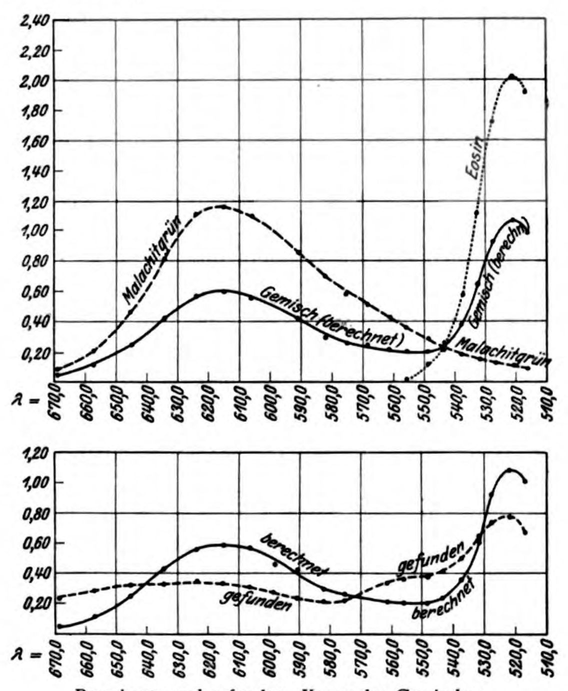
Versuchsreihe 4. Eosin und Malachitgrün.

Eine 0,0775proz. Eosin-Stammlösung habe ich 50fach, die 0,0709proz. Malachitgrün-Stammlösung aber 100fach verdünnt und gleiche Volumina der beiden Verdünnungen vermischt. In diesem Gemisch wichen, wie aus Tabelle IV und namentlich aus Abb. 4 hervorgeht, die gefundenen Werte von den berechneten erheblich ab, indem sie, vom roten Spektralende an gerechnet, weit größer, dann weit kleiner, dann wieder größer und wieder kleiner ausfielen als die berechneten. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß aus den beiden Farbstoffkomponenten ein neuer Farbstoff mit abweichender Lichtabsorption entstanden ist, was übrigens auch dem Umstande entspricht, daß das Eosin den Charakter einer Säure, das Malachitgrün aber den einer Base hat. Auf die Bildung einer neuen Verbindung, oder aber zum mindesten einer Adsorptionsbindung zwischen beiden Komponenten weist auch der Umstand hin, daß sich in vielen ähnlich hergestellten Gemischen einige Stunden bzw. mehrere Tage nach ihrer Herstellung ein reichlicher dunkel gefärbter Niederschlag gebildet hatte. (Es braucht wohl nicht betont zu werden, daß alle diese Gemische zu der

Tabelle IV.

Spektralstelle $\mu\mu$	ε in der Eosinlösung	ε in der Malachitgrünlösung	ε im Eosin-Malachitgrüngemisch		Unterschied in Proz. des berechneten Wertes
			gefunden	berechnet	
669,5	—	0,0881	0,223	0,044	+ 400
657,2	—	0,209	0,265	0,105	+ 152
645,9	—	0,458	0,300	0,229	+ 31
635,4	—	0,802	0,304	0,401	— 31
625,5	—	1,11	0,324	0,555	— 70
615,9	—	1,17	0,319	0,585	— 82
606,7	—	1,08	0,296	0,540	— 83
598,3	—	0,875	0,271	0,437	— 62
590,3	—	0,834	0,228	0,417	— 83
582,5	—	0,685	0,208	0,342	— 64
575,5	—	0,580	0,216	0,290	— 34
568,5	—	0,506	0,259	0,253	+ 2
561,5	—	0,417	0,319	0,208	+ 53
555,2	0,0396	0,360	0,341	0,200	+ 70
549,2	0,103	0,277	0,370	0,190	+ 95
543,1	0,251	0,220	0,416	0,235	+ 77
537,4	0,580	0,178	0,498	0,379	+ 31
532,2	1,13	0,163	0,603	0,645	— 7
527,0	1,71	0,132	0,726	0,920	— 27
521,8	2,01	0,108	0,782	1,06	— 35
516,9	1,92	0,0908	0,658	1,00	— 54

Zeit, als an ihnen die spektrophotometrische Prüfung vorgenommen wurde, kristallklar, noch ohne die geringste Spur einer Niederschlagsbildung, gewesen sind.)



Berechnete und gefundene Kurve des Gemisches.

Abb. 4. *Eosin und Malachitgrün.* Kurven der beiden Komponenten und aus diesen berechnete Kurve des Gemisches.

Aus Abb. 4 ist auch klar zu ersehen, daß das Gemisch die Maxima der Lichtabsorption an denselben Spektralstellen aufweist, wo die beiden Komponenten ihre Maxima haben, woraus sich schließen läßt, daß die beiden Komponenten nicht ihrer Gänze nach, sondern bloß zu einem gewissen Anteil zur Bildung des neuen Farbstoffes verbraucht wurden. Zum Studium der quantitativen Verhältnisse wäre es besonders lehrreich gewesen, die oben erwähnten Niederschläge in Lösung zu bringen und einer spektrophotometrischen Prüfung zu unterwerfen. Leider waren aber die Niederschläge in Wasser unlöslich, auch in Alkohol nur unvollkommen löslich, so daß die spektrophotometrische Prüfung nicht ausgeführt werden konnte.

Versuchsreihe 5. Eosin und Türkischblau.

Von der 0,0775proz. Eosin-Stammlösung und von einer 0,0815proz. Türkischblau-Stammlösung wurden je 50fache Verdünnungen hergestellt, von diesen gleiche Volumina vermischt und das Gemisch

Tabelle V.

Spektralstelle $\mu\mu$	ε in der Eosinlösung	ε in der Türkischblaulösung	ε im Eosin-Türkischblaugemisch		Unterschied in Proz. des berechneten Wertes
			gefunden	berechnet	
681,9	—	0,135	0,401	0,0675	+ 485
669,5	—	0,341	0,450	0,170	+ 163
657,2	—	0,769	0,522	0,385	+ 36
645,9	—	1,42	0,625	0,710	— 13
635,4	—	2,20	0,687	1,10	— 60
625,5	—	2,25	0,694	1,13	— 64
615,9	—	1,96	0,594	0,980	— 65
606,7	—	1,55	0,482	0,775	— 60
598,3	—	1,30	0,416	0,649	— 56
590,3	—	1,13	0,358	0,568	— 58
582,5	—	1,00	0,327	0,498	— 55
575,5	—	0,863	0,329	0,431	— 31
568,5	—	0,736	0,370	0,368	+ 1
561,5	—	0,575	0,444	0,287	+ 35
555,2	0,0396	0,459	0,499	0,249	+ 100
549,2	0,102	0,371	0,522	0,237	+ 120
543,1	0,251	0,304	0,550	0,277	+ 99
537,4	0,580	0,266	0,573	0,423	+ 35
532,2	1,13	0,226	0,576	0,677	— 18
527,0	1,71	0,190	0,604	0,950	— 57
521,8	2,01	0,166	0,605	1,09	— 80
516,9	1,92	0,146	0,569	1,03	— 81
512,4	1,62	0,122	0,532	0,870	— 63

Berechnete und gefundene Kurve des Gemisches.

Abb. 5. *Eosin und Türkischblau.* Kurven der beiden Komponenten und aus diesen berechnete Kurve des Gemisches.

spektrophotometrisch geprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die aus der Tabelle V und der Abb. 5 zu ersehen sind, weisen eine große Ähnlichkeit mit denen der vorausgehenden Versuchsreihe IV auf. Die gefundenen Werte weichen auch hier erheblich von den berechneten ab: am roten Spektralende sind sie weit größer, dann weit kleiner, dann wieder weit größer und wieder weit kleiner als die berechneten. Es mußte also auch hier zur Bildung eines neuen Farbstoffes bzw. einer Adsorptionsbindung gekommen sein, entsprechend dem Umstande, daß Eosin den Charakter einer Säure, Türkischblau aber den einer Base hat.

II.

Es hat sich weiterhin die Frage ergeben, ob sich nicht aus dem spektralen Verhalten der beiden letztgenannten Farbstoffpaare Anhaltspunkte darüber gewinnen ließen, zu welchen Anteilen die jeweiligen Farbstoffkomponenten an der Bildung der neuen Verbindung beteiligt sind.

Der Lösung dieser Frage waren zwei längere Versuchsreihen gewidmet, in denen Eosin stets in derselben Konzentration, Malachitgrün bzw. Türkischblau aber in wechselnden Konzentrationen zur Verwendung kamen. Jedes dieser Gemische wurde einerseits an der Spektralstelle 615,9 bzw. 625,5 $\mu\mu$, wo die Lichtabsorption des Malachitgrüns bzw. des Türkischblau ihr Maximum hat, andererseits an der Spektralstelle 521,8 $\mu\mu$, wo die Lichtabsorption des Eosins ihr Maximum hat, untersucht; sodann aus dem Gehalte des Gemisches an den Komponenten berechnet, welche Lichtabsorption dem Gemisch eigentlich zukäme. Aus dem Vergleich der gefundenen und der berechneten Werte ging unzweifelhaft hervor, daß in den Gemischen die Konzentration beider Komponenten abgenommen hatte, was eindeutig auf die Bildung einer neuen (Adsorptions- ?) Verbindung hinweist. Es konnte auch ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen ursprünglicher Konzentration der Komponenten und ihrer aus den Lösungsgemischen verschwindenden Mengen konstatiert werden; doch sind diese Untersuchungen hauptsächlich infolge gewisser Schwierigkeiten in der Art der Berechnung der Ergebnisse zurzeit noch nicht abgeschlossen, daher von ihrer Veröffentlichung zunächst abgesehen werden soll.

Gegen die von mir gegebene Deutung der geschilderten Versuchsergebnisse könnten zwei Einwände geltend gemacht werden: a) meine Befunde könnten durch die von mir nicht berücksichtigte eventuelle Dissoziation der verschiedenartig verdünnten Farbstoffe bedingt sein; b) ist das *Beer*sche Gesetz für die von mir verwendeten (weil kolloiden) Farbstofflösungen nicht gültig, so könnten, da ich bei verschiedensten Schichtdicken arbeiten mußte, hierdurch allein schon schwer ins Gewicht fallende Versuchsfehler entstehen.

Diese möglichen Einwände sollen in folgendem entkräftet werden: Vor allem ist zu bedenken, daß die von mir verwendeten Farbstofflösungen sehr stark verdünnt waren (bezüglich je eines Farbstoffes mehrere Hunderttausendstel normal); an eine irgend in Betracht kommende Dissoziation muß bei diesen Verdünnungen wohl nicht gedacht werden. Trotzdem habe ich, um das etwaige Vorhandensein einer Dissoziation nachweisen zu können, den Extinktionskoeffizienten der von mir verwendeten Türkischblaulösung in mehreren Versuchsreihen und bei verschiedensten Konzentrationen an der Stelle der maximalen Lichtabsorption dieses Farbstoffes, bei 625,5 $\mu\mu$ bestimmt, doch habe ich, wie aus nachstehender Zusammenstellung ersichtlich, *keinen* gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen Verdünnungsgrad und dem Extinktionskoeffizienten gefunden. In dieser Zusammenstellung ist mit 1 die Konzentration derjenigen Türkischblaulösung bezeichnet, die zu den vorangehend beschriebenen Versuchen (s. Tabelle V) verwendet wurde.

Versuchsreihe	Konzentration											Mittelwert
	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30	0,50	0,75	1	1,5	2	4	
A	—	—	2,42	—	2,35	2,13	—	2,25	2,07	2,40	2,27	2,27
B	—	—	—	—	—	—	—	2,33	2,44 2,48	—	—	2,42
C	2,26	2,23	—	2,41	—	2,32	2,14	2,23	—	2,35	—	2,28
D	2,28	2,27	—	2,45	—	2,27	2,15	2,34	—	2,32	—	2,30
E	—	—	—	2,38	—	2,31	2,23	—	—	—	—	2,31
Mittelwerte	2,27	2,25	2,42	2,41	2,35	2,28	2,17	2,29	2,33	2,36	2,27	

Die vorhandenen Unstimmigkeiten sind nicht anders als aus den mehr oder weniger unvermeidlichen Versuchsfehlern hervorgehend zu deuten.

Um endlich darzutun, daß das *Beer*sche Gesetz auch in diesen (allerdings überaus verdünnten) kolloiden Lösungen gültig ist, habe ich nachfolgend die Schichtdicken zusammengestellt, bei denen die obigen Bestimmungen ausgeführt wurden. Die beobachteten Schwankungen rühren zweifellos von Versuchs- bzw. Ablesungsfehlern her.

Versuchsreihe	Schichtdicke in mm					
	50	20	10	5	2	1
A	—	2,42	2,35 2,13	2,25	2,07 (?) 2,40	2,27
B	—	—	—	2,35	2,44 2,49	—
C	2,26	2,23 2,41	2,32	2,14 2,23	2,35	—
D	2,28	2,27 2,45	2,27	2,15 2,34	2,32	—
E	—	2,38	2,31	2,22	—	—
Mittelwerte	2,27	2,36	2,27	2,24	2,34	2,27

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Es wurde auf dem Wege der Spektrophotometrie nachgewiesen,

a) daß es Farbstoffe gibt, die, da sie den gleichen Charakter haben, im Gemisch ihrer Lösungen aufeinander nicht einwirken. Solche sind die Farbstoffpaare Fuchsin und Malachitgrün, Fuchsin und Methylenblau;

b) daß es Farbstoffpaare entgegengesetzten Charakters geben kann, die aufeinander nicht einwirken. Als solches erwies sich das Farbstoffpaar Säureviolett und Malachitgrün;

c) daß es Farbstoffpaare entgegengesetzten Charakters gibt, an denen die gegenseitige Einwirkung wohl nachzuweisen ist. Solche Paare sind Malachitgrün und Eosin, Türkischblau und Eosin.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Paul Hári* ausgeführt.

Beiträge zur Kenntnis der Gallensekretion. III.

Von

Ernst Neubauer.

(Aus der I. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 15. Februar 1924.)

Früher mitgeteilte Untersuchungen[1]) hatten ergeben, daß außer der Cholsäure und Desoxycholsäure, die in der normalen Galle vorkommen, nur die Dehydrocholsäure die Gallensekretion steigert, stärker als die Cholsäure, von der sie sich in ihrem Bau nur durch das Auftreten von drei CO-Gruppen an Stelle dreier CHOH-Gruppen unterscheidet[2]). Die verhältnismäßig geringe Oberflächenaktivität der Dehydrocholsäure ließ vermuten, daß sie weniger giftig sei als die Cholsäure, eine Annahme, die sich im Hämolyseversuch, am Froschherzen, am Gesamtorganismus von Meerschweinchen, Hund und Mensch als Tatsache erweisen ließ[3]).

Es lag nun die Frage nahe, ob die *Dehydrierung*, die Umwandlung von CHOH- in CO-Gruppen ein *allgemeineres Prinzip der Entgiftung einerseits, der Wirksamkeitssteigerung andererseits* darstellt, oder ob der Fall der Dehydrocholsäure ein ganz vereinzelter sei. Zunächst war zu untersuchen, ob die durch Dehydrierung der bis nun als die am stärksten galletreibende, aber auch als giftigste der wirksamen Gallensäuren erkannten Desoxycholsäure erhaltene Dehydrodesoxycholsäure (Dhdo-chs) noch stärker die Gallensekretion anregt und dabei weniger giftig ist als ihre Muttersubstanz.

In Versuchen, die in gleicher Art angeordnet waren wie die in früheren Mitteilungen beschriebenen, erwies sich die Dhdo-chs[4]) als

---

[1]) *Ernst Neubauer*, diese Zeitschr. **130**, 556, 1922; *J. Pohl*, Zeitschr. f. exper. Med. **30**, 423, 1922.

[2]) *Wieland* und *Schlichting*, Zeitschr. f. phys. Chem. **123**, 213, 1922; *Wieland* und *Fukelman*, ebendaselbst **130**, 144, 1923.

[3]) *Ernst Neubauer*, Klin. Wochenschr. **2**, 1065, 1923.

[4]) Die Dehydrodesoxycholsäure stellte ich mir durch Chromsäureoxydation der Desoxycholsäure dar analog dem Vorgehen *Hammarstens* bei der Darstellung der Dehydrocholsäure; größere Substanzmengen verdanke ich dem Entgegenkommen der chemischen Fabrik C. H. Boehringer in Nieder-Ingelheim.

stark cholagog, etwas, wenn auch nicht viel stärker als die so kräftig wirkende Desoxycholsäure, wie sich besonders aus einem Überblick über eine größere Versuchsreihe aber auch bei vergleichender Beobachtung der Wirkung dieser beiden Substanzen an demselben Tiere ergibt. Auch bei subkutaner Einverleibung steigert die Dhdo-chs die Gallensekretion in hohem Grade. Ihre Wirkung auf die Oberflächenspannung der Galle ist gleichartig der der Cholsäure und der Dehydrocholsäure; die Oberflächenspannung nimmt zu, nähert sich der des Wassers, während sie nach Desoxycholsäurezufuhr sinkt oder gleichbleibt. Die Färbungsintensität der Galle nimmt unter Dhdo-chs-Einfluß nicht wie nach gleich großen Desoxycholsäuregaben zu.

Versuch 43. Weibliches Kaninchen, 2700 g. Urethannarkose, Jugularvenenkanüle, Choledochusfistel bei abgeklemmtem d. cysticus.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockensubstanz in Proz.	Trockensubstanz in g	Trockensubstanz in g für 15 Min. berechnet	Viskosität	Bemerkungen
4h —4h15′	2,9	—	—	—	—	—	—	
4 15′—4 30	2,8	—	—	—	—	—	—	
4 30—4 45	2,9	—	—	—	—	—	—	
4h —4h45′	8,6	628,6	1009,8	1,95	0,1677	0,0559	108,1	Um 4h 45′ werden 2,5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natr. cholalic. in physiol. Na Cl-Lösung intravenös injiziert.
4h45′—5h	3,8	—	—	—	—	—	—	
5 —5 15′	2,4	—	—	—	—	—	—	
4h45′—5h15′	**6,2**	**655,6**	**1010,8**	**2,88**	**0,1476**	**0,0788**	**109,5**	
5h15′—5h30′	2,1	—	—	—	—	—	—	
5 30—5 45	2,1	—	—	—	—	—	—	
5 45—6	2,0	—	—	—	—	—	—	
5h15′—6h	6,2	643,7	1009,8	2,04	0,1265	0,0422	108,7	
6h —6h15′	1,9	—	—	—	—	—	—	
6 15′—6 30	1,9	—	—	—	—	—	—	
6 30—6 45	1,8	—	—	—	—	—	—	
6h —6h45′	5,6	636,2	1009,3	1,80	0,1008	0,0333	108,7	Um 6h 45′ 5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natr. dehydrodesoxycholalic. i. physiol. Na Cl-Lösung intravenös injiziert.
6h45′—7h	7,5	—	—	—	—	—	—	
7 —7 15′	3,5	—	—	—	—	—	—	
6h45′—7h15′	**11,0**	**648,8**	**1009,7**	**1,98**	**0,2178**	**0,1089**	**111,2**	
7h15′—7h30′	2,5	—	—	—	—	—	—	
7 30—7 45	1,8	—	—	—	—	—	—	
7 45—8	1,2	—	—	—	—	—	—	
8 —8 15	1,0	—	—	—	—	—	—	
7h15′—8h15′	6,5	639,0	1009,4	1,83	0,1189	0,0297	108,4	Harn hämoglobinfrei.

Versuch 44. Weibliches Kaninchen, 3700 g. Urethannarkose, Jugularvenenkanüle, Choledochusfistel bei abgeklemmtem d. cysticus.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockensubstanz in Proz.	Trockensubstanz in g	Trockensubstanz in g für 15 Min. berechnet	Viskosität	Bemerkungen
4h45'—5h	7,6	—	—	—	—	—	—	
5 —5 15'	6,0	—	—	—	—	—	—	
4h45'—5h15'	13,6	631,3	1007,0	1,77	0,2407	0,1203	102,5	
5h15'—5h30'	6,0	—	—	—	—	—	—	
5 30—5 45	5,7	—	—	—	—	—	—	
5h15'—5h45'	11,7	636,8	1007,3	1,40	0,1238	0,0619	102,1	Um 6h 14' werden 2,5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natr. dehydrodesoxycholalic. in physiol. NaCl-Lösung intravenös injiziert.
5h45'—6h	5,8	—	—	—	—	—	—	
6 —6 15'	5,6	—	—	—	—	—	—	
5h45'—6h15'	11,4	636,9	1007,0	1,32	0,1505	0,0752	101,0	
6h15'—6h30'	11,7	**647,1**	**1008,2**	**1,72**	**0,2012**	**0,2012**	**101,0**	7h Harn hämoglobinfrei.
6h30—6h45	5,5	—	—	—	—	—	—	
6 45—7	5,0	—	—	—	—	—	—	
6h30'—7h	10,5	634,9	1006,9	1,32	0,1386	0,0693	100,7	Um 6h 59' werden 2,5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natr. desoxycholalic. in physiol. NaCl-Lösung intravenös injiziert.
7h —7h15'	9,7	**629,8**	**1008,7**	**1,59**	**0,1542**	**0,1542**	**101,4**	
7h15—7h30	5,0	—	—	—	—	—	—	
7 30—7 45	4,8	—	—	—	—	—	—	
7h15'—7h45'	9,8	635,3	1008,3	1,26	0,1235	0,0612	100,0	7h35' Harn tief blutrot.
7h45'—8h	10,0	**648,8**	**1008,9**	**1,44**	**0,1440**	**0,1440**	**101,4**	Um 7h 45' dieselbe Injektion wie um 6h 14'.
8h —8h15	5,5	—	—	—	—	—	—	
8 15—8 30	5,2	—	—	—	—	—	—	
8h —8h30'	10,7	640,3	1007,4	1,39	0,1487	0,0743	100,7	

Um einen Anhaltspunkt für die Größe der Giftigkeit der Dhdo-chs zu gewinnen, wurde auf Grund der bei der Dehydrocholsäure gewonnenen Erfahrung zunächst die *Oberflächenaktivität* ihres Natriumsalzes in wässeriger Lösung verschiedener Konzentration mit dem *Traube*schen Viskostagnometer untersucht. Es ergab sich, daß die Oberflächenspannung einer gleich starken Lösung von dehydrodesoxycholsaurem

Versuch 45. Oberflächenspannungswerte bezogen auf Wasser = 1000.

Konzentration Proz.	Desoxycholsaures Natrium (*Boehringer*)	Cholsaures Natrium (*Merck*)	Dehydrodesoxycholsaures Natrium	Dehydrocholsaures Natrium
1,5	650	678	660	800
1,0	650	679	723	851
0,5	643	675	763	895
0,1	658	790	850	976
0,05	700	813	882	987

Natrium unterhalb einer $1\frac{1}{2}$proz. Konzentration höher ist als die der Natriumsalze der Desoxycholsäure und auch der Cholsäure, niedriger als die der Dehydrocholsäure.

Der geringeren Oberflächenaktivität entsprechend, ist auch die *hämolytische Wirksamkeit* der Dhdo-chs schwächer als die der Desoxycholsäure, sie ist noch etwas geringer als die der Cholsäure; das ist offenbar die Ursache dafür, daß die angewandten Dosen der Dhdo-chs nicht wie die gleich großen der Desoxycholsäure den Harn hämoglobinhaltig, die Galle reicher an Farbstoff machen.

Versuch 46. Je 1 ccm einer Lösung von desoxycholsaurem oder dehydrodesoxycholsaurem Natrium verschiedener Konzentration in physiologischer NaCl-Lösung oder Menschenserum wird mit drei Tropfen 5proz. Aufschwemmung gewaschener menschlicher Erythrocyten versetzt; nach einstündigem Stehen bei 37° wird der Grad der Hämolyse abgelesen.

1 ccm physiologischer NaCl-Lösung mit desoxycholsaurem Natrium:
1 : 1800 gibt . . . . . vollständige Hämolyse,
1 : 2000 „ . . . . . fast vollständige Hämolyse,
1 : 2200 „ . . . . . 0 Hämolyse,
1 : 2500 „ . . . . . 0 „

1 ccm physiologischer NaCl-Lösung mit dehydrodesoxycholsaurem Na:
1 : 100 gibt . . . . . vollständige Hämolyse,
1 : 125 „ . . . . . „ „
1 : 160 „ . . . . . 0 Hämolyse.

1 ccm Menschenserum mit dehydrodesoxycholsaurem Natrium:
1 : 20 gibt . . . . . . vollständige Hämolyse,
1 : 40 „ . . . . teilweise „
1 : 80 „ . . . . 0 Hämolyse.

Von einer Prüfung der Dhdo-chs am isolierten Froschherzen, wie ich sie für die Dehydrocholsäure im Vergleich zur Cholsäure durchgeführt hatte, wurde abgesehen, da Beobachtungen am Kaninchen, die eine zweifellos geringere *Herzwirkung* der Dhdo-chs als die der Desoxycholsäure ergaben, sie als überflüssig erscheinen ließen. In dem oben angeführten Versuch 43 vertrug z. B. ein Kaninchen die intravenöse Injektion von 5 ccm einer 2proz. Lösung von dhdo-chs Natrium ohne deutliche Herzsymptome, während die halbe Dosis von desoxycholsaurem Natrium bei demselben Tiere zu sofortigem Herzstillstand führte.

Trotz der bei der Dhdo-chs wesentlich herabgesetzten Oberflächenaktivität, hämolytischen und Herzwirkung ist ihre *letale Dosis* bei subkutaner Anwendung, an Meerschweinchen geprüft, nur wenig größer als die der Desoxycholsäure; ganz ähnliches gilt für die Cholsäure im Vergleich zur Desoxycholsäure, für welche beide *Wieland*[1]) eine gleich

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **86**, 79, 1920.

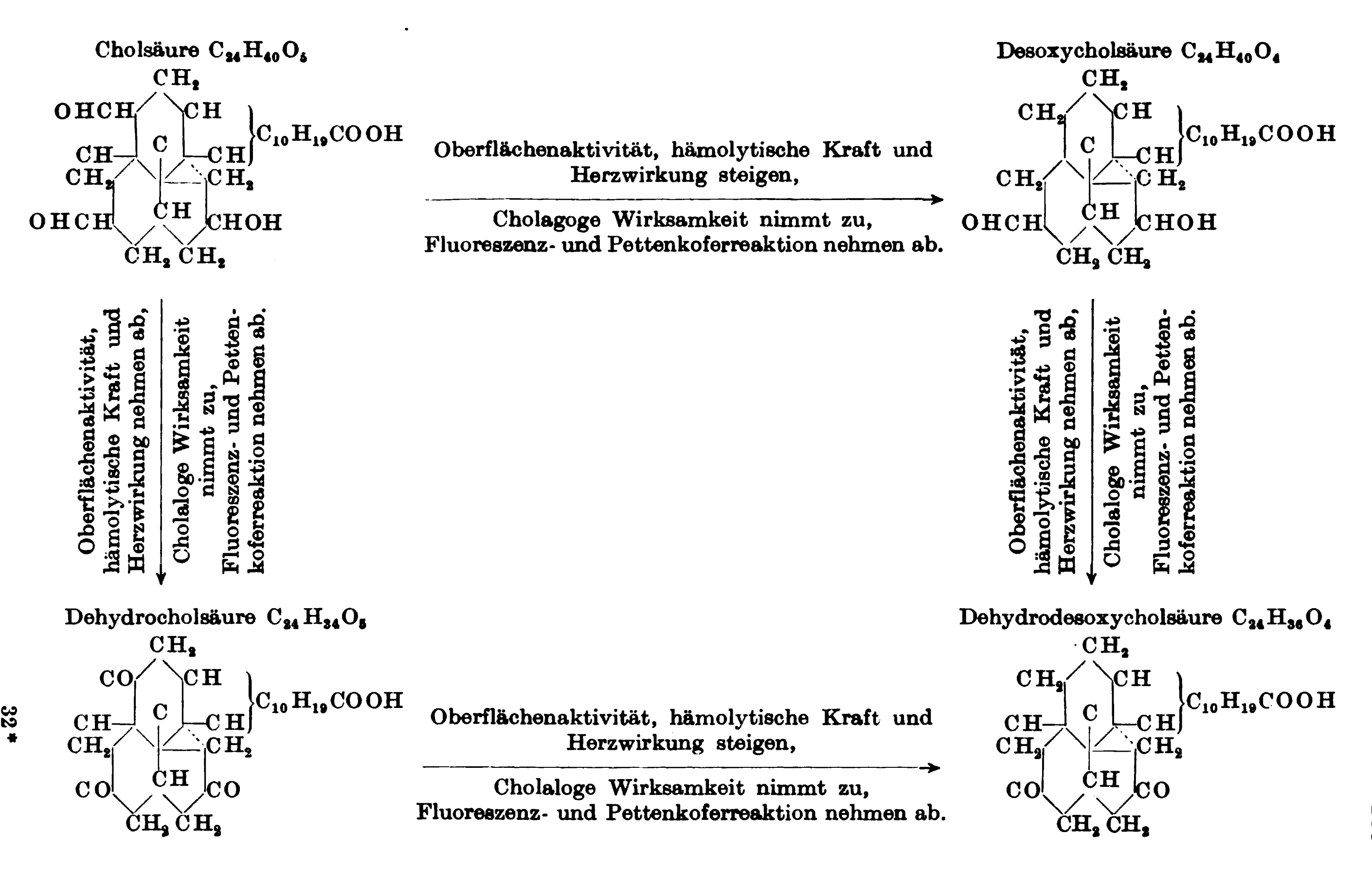
große letale Dosis bei subkutaner Anwendung bei weit auseinanderliegenden Grenzdosen für Hämolyse und Herzwirkung festgestellt hat. Bei giftigen Gaben von Dhdo-chs treten nervöse Erscheinungen in den Vordergrund, Steigerung der Reflexerregbarkeit, Muskelkrämpfe, Laufkrämpfe, Krämpfe, die mit den einander verlangsamt folgenden Atemzügen von der Atemmuskulatur auf die Extremitäten- und Rückenmuskulatur übergreifen; schließlich Atemstillstand.

Versuch 47. Feststellung der letalen Dosis am Meerschweinchen.

Gewicht des Tieres	Subkutane Einspritzung von		Bemerkungen
g	g	g pro kg	
440	0,44 desoxycholsaures Natrium	1	nach 1 Stunde tot
340	0,255 „ „	0,75	„ 36 Stunden tot
540	0,27 „ „	0,50	überlebt
520	1,56 dehydrodesoxycholsaures Natr.	3	nach 3 Stunden tot
480	0,96 „ „	2	„ 26 „ „
330	0,495 „ „	1,5	„ 18 „ „
420	0,42 „ „	1	überlebt

Aus den vorliegenden und früheren Versuchen ergibt sich also, daß noch *eine weitere Gallensäure, die Dehydrodesoxycholsäure, die Gallensekretion anregt,* daß durch *die Dehydrierung der Cholsäure und der Desoxycholsäure Substanzen erhalten werden, die weniger oberflächenaktiv, weniger giftig, stärker galletreibend wirksam sind als ihre Muttersubstanzen;* bei der Cholsäure-Dehydrocholsäure ist der Grad der Wirksamkeitsänderung größer als bei der Desoxycholsäure-Dehydrodesoxycholsäure. *Hämolytische Wirkung, Giftwirkung auf das Herz steigt in der Gallensäuregruppe mit der Oberflächenaktivität, zu der aber die Größe der cholagogen Kraft keine Beziehung hat.* Quantitativ vergleichend angestellte *Fluoreszenz-* und *Pettenkoferproben* zeigten eine geringe Abnahme der Fluoreszenzreaktion von der Cholsäure zur Desoxycholsäure und ein fast völliges Schwinden zur Dehydro- und besonders zur Dehydrodesoxycholsäure; die Pettenkoferprobe geben mit typischer Färbung nur die Cholsäure und etwas schwächer die Desoxycholsäure, die dehydrierten Säuren mit gelbem Farbenton, der von der Dehydro- zur Dehydrodesoxycholsäure an Stärke abnimmt; die *Eigenschaften der Gallensäuren, welche diese Reaktionen bedingen, stehen demnach wohl in keiner Beziehung zur Größe weder der Giftigkeit noch der cholagogen Wirkung der Gallensäuren.*

Die dargelegten Verhältnisse zeigt deutlich folgende Übersicht mit den *Wieland*schen Strukturformeln.


Cholsäure $C_{24}H_{40}O_5$
Oberflächenaktivität, hämolytische Kraft und Herzwirkung steigen,
Cholagoge Wirksamkeit nimmt zu, Fluoreszenz- und Pettenkoferreaktion nehmen ab.
Desoxycholsäure $C_{24}H_{40}O_4$
Oberflächenaktivität, hämolytische Kraft und Herzwirkung nehmen ab,
Cholaloge Wirksamkeit nimmt zu, Fluoreszenz- und Pettenkoferreaktion nehmen ab.
Oberflächenaktivität, hämolytische Kraft und Herzwirkung nehmen ab,
Cholaloge Wirksamkeit nimmt zu, Fluoreszenz- und Pettenkoferreaktion nehmen ab.
Dehydrocholsäure $C_{24}H_{34}O_5$
Oberflächenaktivität, hämolytische Kraft und Herzwirkung steigen,
Cholaloge Wirksamkeit nimmt zu, Fluoreszenz- und Pettenkoferreaktion nehmen ab.
Dehydrodesoxycholsäure $C_{24}H_{36}O_4$

Über die Blackmansche Reaktion.

Von

Otto Warburg und Tsunao Uyesugi.

(Eingegangen am 18. Februar 1924.)

Als *Blackman*sche Reaktion bezeichnen wir den chemischen Vorgang, der bei sehr starker Bestrahlung einer grünen Zelle das Tempo der Kohlensäurespaltung bestimmt. Die *Blackman*sche Reaktion zeichnet sich aus durch ihre Temperaturempfindlichkeit[1]) und ihre Blausäureempfindlichkeit[2]). Erhöhung der Temperatur beschleunigt sie, Blausäure in kleinen Konzentrationen hemmt sie. Die übrigen Teilvorgänge der Assimilation sind weder temperatur- noch blausäureempfindlich. Bestrahlen wir eine grüne Zelle sehr schwach, so bewirkt Erhöhung der Temperatur keine Beschleunigung[1]), Blausäure keine Hemmung[2]) der Kohlensäurespaltung.

Fragt man nach der Bedeutung der *Blackman*schen Reaktion, so liegen, wie es scheint, zwei Möglichkeiten vor: sie kann eine „vorbereitende" Reaktion sein, die der Wirkung des Lichtes vorangeht, oder eine „fortführende" Reaktion, die auf die Wirkung des Lichtes folgt. Beide Auffassungen sind geäußert worden, die erste von *Warburg*[2]), die zweite von *Willstätter*[3]); beide lassen sie sich in Einklang bringen mit der Kinetik des Assimilationsvorganges, die also nicht imstande ist, eine Entscheidung zwischen beiden Theorien zu treffen.

Warburg nahm an, in der *Blackman*schen Reaktion bilde sich der „photochemische Acceptor", ein photochemisch angreifbares Derivat der Kohlensäure. *Willstätter* sprach die Vermutung aus, bei der photochemischen Reduktion der Kohlensäure entstehe ein Peroxyd, und die Abspaltung von Sauerstoff aus diesem Peroxyd sei die *Blackman*sche Reaktion. Da sich die Theorie von *Warburg* nicht bewährt hat, so soll

---

[1]) *Blackman*, Ann. of Bot. **19**, 281, 1905.

[2]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919; **103**, 188, 1920.

[3]) *Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

sie aufgegeben werden. Ist *Willstätters* Theorie richtig, so ist anzunehmen, daß Peroxyde, in eine lebende grüne Zelle eingeführt, gespalten werden und daß diese Spaltung sich ähnlich verhält wie die *Blackman*sche Reaktion. Von diesem Gesichtspunkte aus haben wir die Spaltung von Wasserstoffperoxyd durch Chlorella näher untersucht und diese Peroxydspaltung mit der *Blackman*schen Reaktion verglichen.

Die Anordnung der Versuche war folgende: Wir suspendierten Chlorellen in *Knop*scher Lösung, brachten die Suspensionen in Atmungströge, die in einem Thermostaten bewegt wurden, und ließen, wenn Temperaturgleichgewicht eingetreten war, aus einer kleinen Birne so viel Wasserstoffperoxyd zufließen, daß die Konzentration an Peroxyd in der *Knop*schen Lösung m/300 war. *Knop*sche Lösung, die sauer ist, zersetzt unter den Bedingungen unserer Versuche Wasserstoffperoxyd nicht merklich. Sind jedoch Chlorellen in der Lösung, so wird Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff gespalten, und die Geschwindigkeit dieser Spaltung kann an einem angeschlossenen Barcroftmanometer genau verfolgt werden. Wählt man dabei die Zellmengen so klein, daß in den ersten 15 bis 30 Minuten nach Zugabe des Wasserstoffperoxyds die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung nur wenig abfällt, so kann man ohne umständliche Rechnung die Geschwindigkeit des Zerfalls aus den beobachteten Druckänderungen berechnen und — wenn die verwendeten Zellmengen gleich sind — die Geschwindigkeiten des Zerfalls unter der Einwirkung verschiedener Stoffe vergleichen. Erscheint beispielsweise in reiner *Knop*scher Lösung nach t Minuten der Druck p_0 und unter sonst gleichen Bedingungen nach Zusatz eines Stoffes der kleinere Druck p_1, so ist die Hemmung der Zerfallsgeschwindigkeit, die der zugesetzte Stoff hervorbringt, gleich $\frac{p_0 - p_1}{p_0}$.

Mit Hilfe dieser Anordnung haben wir zunächst die Wirkung der Blausäure auf den Zerfall des Wasserstoffperoxyds untersucht. Spalte 2 der Tabelle I enthält das Ergebnis der Messungen. Blausäure hemmt den Zerfall des Peroxyds, und zwar beginnt die Hemmung bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{200000}$ Mol pro Liter und ist bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{1000}$ Mol pro Liter fast vollständig. Nachdem dies festgestellt war, haben wir die früheren Versuche[1]) über die Wirkung der Blausäure auf die *Blackman*sche Reaktion wiederholt, um die Wirkung der Blausäure auf beide Vorgänge für dieselbe Chlorellakultur vergleichen zu können. Wir hielten uns dabei genau an die früher beschriebene Versuchsanordnung und bestimmten die Wirkung der Blausäure auf die Sauerstoffentwicklung einer sehr stark bestrahlten

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919; **103**, 188, 1920.

Tabelle I.

Konzentration der Blausäure	1 Hemmung der *Blackman*schen Reaktion Proz.	2 Hemmung des Wasserstoffperoxydzerfalls Proz.
n/200 000 . . .	20	32
n/10 000	55	83
n/1000	95	93

kohlensäurehaltigen Algensuspension in Lösungen, die natürlich frei von Wasserstoffperoxyd waren.

Spalte 1 der Tabelle I enthält das Ergebnis der Messungen. Die *Blackman*sche Reaktion wird durch Blausäure gehemmt, und zwar beginnt die Hemmung bei einigen $^1/_{100000}$ Molen Blausäure pro Liter und ist bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{1000}$ Mol pro Liter fast vollständig. Die Übereinstimmung in dem Verhalten der beiden Vorgänge, der Peroxydspaltung im Dunkeln und der Sauerstoffentwicklung aus Kohlensäure bei Bestrahlung, gegenüber Blausäure ist also eine weitgehende, wenn auch die Form der Hemmungskurven in beiden Fällen verschieden zu sein scheint.

Des weiteren haben wir die Wirkung einiger Narkotika auf den Zerfall des Wasserstoffperoxyds untersucht, und zwar die Wirkung der Urethane. Spalte 3 der Tabelle II enthält das Ergebnis der

Tabelle II.

Narkotikum	1 Atmungshemmung um 50 Proz. durch Millimol/Liter	2 Hemmung der *Blackman*schen Reaktion um 50 Proz. durch Millimol/Liter	3 Hemmung des H_2O_2-Zerfalls um 50 Proz. durch Millimol/Liter
Methylurethan . . .	1200	660	440
Äthylurethan	780	225	135
Propylurethan . . .	100	73	80
Butylurethan (iso) . .	43	26	27
Amylurethan (iso) . .	32	12	weniger als 9
Phenylurethan . . .	6	0,5	„ „ 1,5

Messungen, aus denen man erkennt, daß der Peroxydzerfall durch Narkotika gehemmt wird, und daß er ein Vorgang ist, der sich an Oberflächen abspielt. Nachdem dies festgestellt war, haben wir die Versuche *A. v. Rankes*[1]) über die Beeinflussung der *Blackman*schen Reaktion durch Narkotika wiederholt, um so die Wirkung der Narkotika auf beide Vorgänge für dieselbe Chlorellakultur vergleichen zu können.

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919; **103**, 188, 1920.

Wir hielten uns dabei genau an die früher beschriebene Versuchsanordnung und fanden mit geringen Abweichungen dieselben Werte wie *A. v. Ranke* (vgl. Spalte 2 der Tabelle II). In Spalte 1 der Tabelle II führen wir noch die Werte für die Atmungshemmung der Chlorella an, die wir nicht neu bestimmt, sondern einer früheren Arbeit[1]) entnommen haben. Bei Betrachtung der Tabelle II erkennt man die weitgehende Übereinstimmung in dem Verhalten der Peroxydspaltung und der *Blackman*schen Reaktion gegenüber den geprüften Narkotika. Der Peroxydzerfall ist erheblich empfindlicher als die Atmung, aber mindestens ebenso empfindlich wie die *Blackman*sche Reaktion.

Beide Tabellen sprechen durchaus zugunsten von *Willstätters* Theorie. Allerdings ist die Übereinstimmung in dem Verhalten der Peroxydspaltung und der *Blackman*schen Reaktion keine vollkommene, aber eine solche ist auch dann nicht zu erwarten, wenn der Katalysator beider Vorgänge identisch ist. Denn *Willstätters* Peroxyd ist nicht Wasserstoffperoxyd, das Substrat in beiden Fällen also jedenfalls verschieden.

Experimenteller Teil.

Die Chlorellen wurden nach einer früher gegebenen Vorschrift[2]) in *Knop*scher Lösung gezüchtet. Die Zellmengen, die für eine Messung verwendet wurden, waren: für die Messung der Peroxydspaltung je 0,05 ccm Zellen = 10 mg Trockensubstanz pro Trog, für die Messung der *Blackman*schen Reaktion je 0,02 ccm Zellen = 4 mg Trockensubstanz pro Trog. Diese Angaben sollen nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die einzuhaltenden Mengenverhältnisse geben. Die Zellmengen in verschiedenen Versuchen genau gleich zu halten, wäre mühsam und zwecklos, da die Wirksamkeit pro Milligramm Zellsubstanz je nach dem Zustande der Kultur schwankt. Um die Wirkung eines Stoffes zu ermitteln, müssen von ein und derselben Zellsuspension genau gleiche Volumina abpipettiert werden und die in ihnen enthaltenen Zellmengen — *ohne* Zusatz und *mit* Zusatz — gleichzeitig geprüft werden.

Wie schon früher, so stellte sich auch in dieser Arbeit heraus, daß die Atmung der Chlorella schnell im Dunkeln abfällt, offenbar weil die Alge, im Gegensatz zu tierischen Zellen, arm an verbrennlicher Substanz ist. Die Tatsache, daß zugesetzte organische Stoffe, falls ihre Konzentrationen nicht zu hoch sind, die Atmung beschleunigen, erklären wir so, daß sie der Chlorella als Brennmaterial dienen.

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **103**, 188, 1920.
[2]) Zeitschr. f. physik. Chem. **102**, 250, 1922.

Blausäure wirkt, wie sich wiederum[1]) zeigte, selbst in hohen Konzentrationen auf die Atmung der Chlorella nicht hemmend, sondern, wie alle übrigen organischen Stoffe, beschleunigend.

Messung der Wasserstoffperoxydspaltung: Je 10 ccm Zellsuspension wurden in Atmungströge der in dieser Zeitschr. **142**, 494, 1923, abgebildeten Form eingefüllt, in den Einsatz zur Absorption der Atmungskohlensäure 1 ccm 5proz. Kalilauge. Die Suspensionsflüssigkeit war *Knop*sche Lösung, im Gasraume befand sich Luft. Die Temperatur des Thermostaten war 20°, das Zimmer während der Messungen verdunkelt. Das Gesamtvolumen der Gefäße war 30 ccm, die Gefäßkonstante für Sauerstoff, da etwa 11 ccm Flüssigkeit eingefüllt waren, etwa 2, was bedeutet, daß eine Druckänderung von 1 mm den Verbrauch oder die Entwicklung von 2 cmm Sauerstoff anzeigte.

Das Wasserstoffperoxyd war aus Natriumperoxyd und primärem Natriumphosphat nach *W. Friederich* (vgl. *Vanino*, Präparat. Chemie **1**, 10, 1921) hergestellt und im Vakuum destilliert. Je 0,5 ccm einer m/15 Lösung wurden in die Ansatzbirne eingefüllt, ihr Inhalt, nachdem Temperaturausgleich eingetreten war, dem Inhalt des Atmungstroges zugefügt, in dem die Konzentration an Wasserstoffperoxyd dann m/300 war.

Die auftretenden Druckänderungen wurden etwa 30 Minuten lang beobachtet. Für die Berechnung dienten nur die in den ersten 15 Minuten auftretenden Druckänderungen.

Eine Schwierigkeit bei den Peroxydversuchen war die Frage, in welcher Weise die Atmung bei der Berechnung zu berücksichtigen sei. Erhält man in dem peroxyd*freien* Troge infolge der Atmung einen negativen Druck von 20 mm und gleichzeitig in dem peroxyd*haltigen* Troge einen positiven Druck von 100 mm, so weiß man zunächst nicht, ob die Peroxydspaltung 100 oder 120 mm entspricht. Doch ist anzunehmen, daß eine Zelle, der Wasserstoffperoxyd zur Verfügung steht, dieses an Stelle des molekularen Sauerstoffs in der Atmung verbraucht, daß also in einer peroxydhaltigen Lösung molekularer Sauerstoff von der Zelle nicht absorbiert wird. Unter dieser Voraussetzung haben wir die Peroxydspaltung berechnet und nur die *positiven* Drucke berücksichtigt[2]). Erkennt man diese Voraussetzung nicht an, so kann man die Tabellen unter Berücksichtigung der Atmung, die immer angegeben ist, umrechnen. An dem Wesentlichen unserer Ergebnisse ändert sich dadurch nichts.

---

[1]) Diese Zeitschr. **100**, 230, 1919.

[2]) Ist h der beobachtete positive Druck, K_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff, so ist die entwickelte Sauerstoffmenge x_{O_2} in cmm

$$x_{O_2} = h K_{O_2}.$$

Messung der Blackmanschen Reaktion: Die Form der Gefäße war die in dieser Zeitschr. **100**, 246, Abb. 3 abgebildete. Die Suspensionsflüssigkeit war *Knop*sche Lösung, der Gasraum enthielt Luft mit 4 Vol.-Proz. Kohlensäure. Als Lichtquelle verwendeten wir ½-Watt-Metallfadenlampen, und zwar 75-Wattlampen, deren leuchtender Faden sich in einigen Zentimetern Entfernung von dem Assimilationstroge befand. Die Beleuchtungsstärke war dann so hoch, daß ihre Vermehrung ohne Einfluß auf die Kohlensäurespaltung war. Die Lampen wurden nach dieser Zeitschr. **100**, 245, Abb. 2 montiert. Die Temperatur des Thermostaten war 20°.

War K_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff, K_{CO_2} die Gefäßkonstante für Kohlensäure, so war die zersetzte Kohlensäuremenge x_{CO_2} in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = h\,\frac{K_{O_2}\,K_{CO_2}}{K_{CO_2} - K_{O_2}}$$

wo h die beobachtete Druckänderung in Millimetern *Brodie*scher Flüssigkeit bedeutet.

Protokolle.

Tabelle III.

Blausäure auf Atmung und H_2O_2-Zerfall.

HCN Mol/Liter	Atmung		H_2O_2-Zerfall	
	ohne HCN cmm O_2	*mit* HCN cmm O_2	*ohne* HCN cmm O_2	*mit* HCN cmm O_2
$^1/_{200000}$	15′: — 26 30 : — 34	15′: — 24 30 : — 31	15′: + 74 30 : + 157	15′: + 50 30 : + 106
$^1/_{10000}$	15′: — 34 30 : — 44	15′: — 35 30 : — 50	15′: + 62 30 : + 119	15′: + 11 30 : + 32
$^1/_{1000}$	15′: — 8 30 : — 16	15′: — 18 30 : — 35	15′: + 84 30 : + 146	15′: + 6 30 : + 17

Tabelle IV.

Blausäure auf *Blackman*sche Reaktion.

HCN Mol/Liter	Atmung (dunkel)		Assimilation (hell)	
	ohne HCN cmm O_2	*mit* HCN cmm O_2	*ohne* HCN cmm O_2	*mit* HCN cmm O_2
$^1/_{200000}$	15′: — 4 30 : — 6	15′: — 5 30 : — 7	15′: + 43 30 : + 83	15′: + 34 30 : + 64
$^1/_{10000}$	15′: — 4 30 : — 6	15′: — 5 30 : — 9	15′: + 48 30 : + 91	15′: + 18 30 : + 34
$^1/_{1000}$	15′: — 4 30 : — 6	15′: — 7 30 : — 9	15′: + 48 30 : + 97	15′: — 5 30 : — 5

Tabelle V. Urethane auf Atmung und H_2O_2-Zerfall.

Substanz	Gew.-Proz.	Atmung		H_2O_2-Zerfall	
		ohne Urethan cmm O_2	*mit* Urethan cmm O_2	*ohne* Urethan cmm O_2	*mit* Urethan cmm O_2
Methylurethan	2	15′: — 9 30 : — 15	15′: — 12 30 : — 22	15′: + 78 30 : + 146	15′: + 54 30 : + 99
	4	15′: — 12 30 : — 19	15′: — 14 30 : — 26	15′: + 51 30 : + 93	15′: + 19 30 : + 39
Äthylurethan .	1	15′: — 16 30 : — 26	15′: — 25 30 : — 41	15′: + 75 30 : + 136	15′: + 41 30 : + 78
	2	15′: — 15 30 : — 22	15′: — 22 30 : — 35	15′: + 73 30 : + 142	15′: + 22 30 : + 41
Propylurethan	0,5	15′: — 14 30 : — 22	15′: — 21 30 : — 35	15′: + 87 30 : + 152	15′: + 62 30 : + 113
	1	15′: — 9 30 : — 12	15′: — 14 30 : — 21	15′: + 57 30 : + 114	15′: + 23 30 : + 48
Butylurethan .	0,2	15′: — 12 30 : — 20	15′: — 27 30 : — 45	15′: + 97 30 : + 166	15′: + 58 30 : + 102
	0,4	15′: — 16 30 : — 29	15′: — 14 30 : — 27	15′: + 75 30 : + 137	15′: + 32 30 : + 61
Amylurethan .	0,16	15′: — 26 30 : — 33	15′: — 47 30 : — 69	15′: + 73 30 : + 138	15′: + 23 30 : + 50
Phenylurethan	0,025	15′: — 22 30 : — 29	15′: — 43 30 : — 66	15′: + 73 30 : + 138	15′: + 32 30 : + 60

Tabelle VI. Urethane auf *Blackman*sche Reaktion.

Substanz	Gew.-Proz.	Atmung (dunkel)		Assimilation (hell)	
		ohne Urethan cmm O_2	*mit* Urethan cmm O_2	*ohne* Urethan cmm O_2	*mit* Urethan cmm O_2
Methylurethan	3	15′: — 3 30 : — 8	15′: — 5 30 : — 12	15′: + 45 30 : + 84	15′: + 31 30 : + 56
	5	15′: — 5 30 : — 13	15′: — 5 30 : — 10	15′: + 56 30 : + 107	15′: + 20 30 : + 36
Äthylurethan .	2	15′: — 5 30 : — 10	15′: — 5 30 : — 12	15′: + 62 30 : + 124	15′: + 28 30 : + 53
Propylurethan	0,75	15′: — 5 30 : — 13	15′: — 8 30 : — 16	15′: + 94 30 : + 174	15′: + 39 30 : + 66
Butylurethan .	0,3	15′: 30 : — 8	15′: — 30 : — 14	15′: + 134 30 : + 265	15′: + 76 30 : + 154
Amylurethan .	0,16	15′: — 4 30 : — 8	15′: — 8 30 : — 13	15′: + 76 30 : + 164	15′: + 32 30 : + 64
Phenylurethan	0,0088	15′: — 30 : — 4	15′: — 5 30 : — 12	15′: + 155 30 : + 315	15′: + 62 30 : + 118

Das Wesen der Avitaminose.

Nach experimentellen Untersuchungen über die Abmagerungsform dieser Krankheit.

Von

Adolf Bickel.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 19. Februar 1924.)

In den letzten Jahren habe ich nach einem bestimmten Plane in meinem Laboratorium eine Reihe von Arbeiten über das Vitaminproblem anfertigen lassen, die den Zweck verfolgten, die Störungen im Stoffwechsel der organischen und anorganischen Substanz bei völligem Vitaminmangel der Nahrung in ihren großen Umrissen festzulegen. Da die hierzu erforderlichen Einzeluntersuchungen nunmehr vorliegen, haben wir die Möglichkeit, uns das Bild von der Art und Weise der Vitaminwirkung im Körper in seinen großen und wesentlichen Umrissen aufzuzeichnen. Das soll in meiner vorliegenden Studie geschehen.

Die Zahlenhinweise im Text beziehen sich auf die in dem Literaturverzeichnis am Schlusse zusammengestellten Arbeiten, die nach meinen Angaben und unter meiner Leitung ausgeführt wurden. Hieraus sind auch die Namen meiner Mitarbeiter ersichtlich, die die einzelnen Untersuchungen übernommen hatten. Da in jeder dieser Arbeiten die zu dem betreffenden Spezialthema vorliegende anderweitige Literatur berücksichtigt ist, darf ich im Interesse der Kürze der Darstellung von weiteren Literaturhinweisen in meiner eigenen Abhandlung im allgemeinen wohl absehen. Nur da, wo es unerläßlich ist, werde ich im Texte diejenigen Arbeiten unter Namennennung erwähnen, die von anderer Seite zu den jeweils zur Diskussion stehenden Problemen veröffentlicht worden sind.

Letzten Endes wurzelt die Vitaminforschung in jenen bekannten physiologischen Beobachtungen aus dem letzten Drittel des vorigen Jahrhunderts, die in den Arbeiten von *Forster*, von *Salkowski* und in denjenigen aus *Bunges* Laboratorium niedergelegt sind, und aus denen sich ergibt, daß es weder möglich ist, Wachstum und Leben von Tieren zu garantieren, die mit einem aus chemisch reinem Eiweiß, Fett und Kohlehydrat hergestellten Nahrungsgemisch ernährt werden, noch auch gelingt, Tiere auf die Dauer gesund zu halten, die mit einer durch wiederholtes Kochen und Auslaugen mit Wasser hergestellten natürlichen Nahrung gefüttert werden. Damals beschuldigte man den *Salz-*

mangel der Nahrung als Grund für die Krankheitserscheinungen, die alle diese Tiere boten, man wußte nicht, daß eine chemisch reine organische Nahrung auch *vitaminfrei* ist, und daß man mit der Entsalzung auch gleichzeitig die Nahrung der Vitamine beraubt hatte.

Gewiß ruft Salzmangel in der Nahrung eine Fülle von Störungen im Organismus hervor, und es ist eine der brennendsten Fragen der modernen Stoffwechsellehre, welche Änderungen in den Zelleistungen durch den Mangel aller oder einzelner Salze in der Nahrung bewirkt werden, wenn der Körper gleichzeitig über einen genügenden Vitaminvorrat verfügt. Deshalb habe ich mit meinen Mitarbeitern in den verflossenen Jahren gerade auch diesem Problem besondere Aufmerksamkeit gewidmet, und wir haben gefunden, daß der Mangel der sogenannten Zellsalze, nämlich des Kaliums, Calciums, des Magnesiums, des Phosphors, des Eisens, alle in ihren Salzverbindungen, die Oxydationen im Körper herabsetzt (53), daß in Sonderheit Kalium und Calcium im gewissen Sinne antagonistisch (53) auf die oxydativen Vorgänge in den Zellen einwirken, indem Kalium den Sauerstoffverbrauch steigert, während Calcium ihn vermindert. Wir haben weiter gesehen, daß bei Zellsalzmangel auch Störungen im Stickstoffstoffwechsel(37), bei einzelnen Individuen früher, bei anderen später auftreten können, die sich in einer Vermehrung der Stickstoffausfuhr durch den Harn und in einer Erhöhung des Reststickstoffs (52) des Blutes äußern. Wir bemerkten auch gelegentlich eine gewisse Steigerung des Blutzuckers (52) bei leichter Glykogenabnahme in der Leber (54) und sahen endlich Störungen bei der Regeneration von rasch wachsenden Zellen, nämlich bei der Spermatogenese (48) (50) und der Eierbildung (48) auftreten.

Wir erfahren also, daß der *Mangel an Salzen* bei Vitaminreichtum der kalorisch-suffizienten Nahrung sich im *Umsatz der organischen Substanz* bemerkbar macht und auch die formativen Zelleistungen beeinträchtigt, wie umgekehrt auch durch Salze eben diese Leistungen angeregt werden können.

Es haben nun diese durch Salzmangel hervorgerufenen Störungen gewiß vielfach Ähnlichkeit mit denjenigen, denen wir bei Vitaminmangel der Nahrung begegnen; aber trotzdem haben wir heute das Recht, zu behaupten, daß die avitaminösen Erscheinungen nicht mit jenen ätiologisch identisch sind. Denn es erkranken auch diejenigen Tiere, die mit einer kalorisch genügenden, chemisch reinen oder natürlichen Nahrung, die auch alle Salze in hinreichender Menge enthält, ernährt werden, die aber keine Vitamine besitzt oder von ihren Vitaminen künstlich befreit ist. Ja die Lebenszeit vitaminfrei ernährter Tiere ist im wesentlichen auch dieselbe, einerlei, ob die Tiere mit dem salzarmen vitaminfreien Futter Zellsalzzulagen erhalten oder nicht. Auch das haben wir in besonderen Versuchsreihen festgestellt (50).

Im Hinblick auf die ernährungsphysiologische Ungleichwertigkeit verschiedener Eiweißstoffe, deren Kenntnis wir vor allem *Abderhalden* verdanken, ist in diesem Zusammenhange noch besonders zu betonen, daß auch diejenigen Tiere ihre Avitaminose bekommen, die mit physiologisch

vollwertigem Eiweiß, das heißt mit Eiweiß, das die für den zellulären Baustoffwechsel erforderlichen Aminosäuregruppen enthält, ernährt werden, aber keine Vitamine in sich aufnehmen.

Haben schon die Erfahrungen über die Salzwirkung auf den Umsatz der organischen Körpersubstanz uns wichtige Regulatoren des Stoffwechsels dieser letzteren kennengelehrt, so ist das in noch höherem Maße geschehen mit der Erweiterung unserer Kenntnisse über die Vitaminwirkung auf die Vorgänge in der Zelle. Ein Beispiel aus der Lehre vom Stoffwechsel bei der Avitaminose sei hier vorweggenommen, um daran zu zeigen, wie tief die Erforschung der Vitaminwirkung in die Physiologie eingreift, daß es sich hier nicht um ein Problem rein klinischen Interesses handelt, sondern um eine die ganze Biologie umspannende Frage aktuellsten Interesses.

Das Gesetz von der *isodynamischen Vertretbarkeit* der einzelnen organischen Nahrungskomponenten im normalen Körper, nach dem bei einem Eiweißminimum kalorisch gleichwertige Mengen von Eiweiß, Fett oder Kohlehydrat in der Nahrung sich im Stoffwechsel gegenseitig vertreten können, hat durch unsere Untersuchungen für den vitaminfrei ernährten Körper eine Einschränkung erfahren (36). Denn wir konnten zeigen, daß hier bei der Gabe des für den Erhaltungsstoffwechsel des Körpers erforderlichen Eiweißmindestquantums der Gesamtstoffwechsel nur dann längere Zeit noch einigermaßen aufrecht erhalten werden kann, wenn Fett und Kohlehydrat gleichzeitig zur Verfügung stehen. Darum starben vitaminfrei, mit Salz und außerdem *nur* mit Eiweiß ernährte Tiere sehr rasch; die unter solchen Bedingungen mit dem Eiweißminimum und Fett *oder* Kohlehydrat *einseitig* ernährten Tiere leben nicht viel länger. *Im avitaminösen Körper können sich Fett und Kohlehydrat eben nicht in dem Maße vertreten wie im normalen Organismus, und die Fettbildung aus Kohlehydrat ist fast unmöglich geworden oder kommt nicht mehr in Fettablagerung zum Ausdruck.*

Beim *Stoffwechsel* wird der *Vitaminvorrat im Körper verbraucht;* je lebhafter und je umfangreicher die Umsetzungen sind, um so größer ist der Verbrauch, und um so mehr tut not, daß die Vitaminvorräte immer aufs neue mit der Nahrungszufuhr ergänzt werden. Das konnten wir durch die Feststellung zeigen (15), daß der Körper hungernder Tiere über einen größeren Vitaminvorrat verfügt als der Körper von Tieren, die die gleiche Zeit, in der jene gehungert hatten, mit vitaminfreiem Futter reichlich ernährt worden waren. Das geht auch daraus hervor, daß junge, schnell wachsende und darum einen lebhaften Stoffwechsel entwickelnde Tiere bei vitaminfreier Ernährung viel rascher erkranken als alte Individuen. Umgekehrt konnten wir auch den Vitaminbedarf genau ermitteln, den, auf das Körpergewicht bezogen, ein Tier nötig hat, um in normaler Weise zu gedeihen.

Ob nun die Vitamine beim Stoffwechsel zerstört, oder ob sie unverändert ausgeschieden werden, oder ob vielleicht beides zutrifft, ist noch nicht sichergestellt; aber ich will in diesem Zusammenhange darauf hinweisen, daß nach *Ogatas* Beobachtungen der Harn jedenfalls keine Vitamine enthält, was man früher irrtümlich angenommen hatte, nämlich, daß die Nieren die Ausscheidungsorgane für Vitamine seien.

Die historische Entwicklung der Vitaminlehre hat es mit sich gebracht, daß die ersten Tierversuche an Vögeln bei einer Nahrung angestellt wurden, die ausschließlich aus poliertem Reis bestand. Man hat also eine Nahrung gegeben, die *nicht nur vitaminfrei* war, sondern die zugleich auch den *Charakter einer einseitigen Nahrung* trug. Nun haben uns aber besonders die pädiatrischen Erfahrungen der *Czerny*schen Schule darüber belehrt, daß eine solche einseitige Nahrung eben wegen ihrer *Einseitigkeit* bei der Anwesenheit *eines* organischen Nährstoffes unter *Vernachlässigung* der anderen bereits erhebliche Störungen im Gedeihen des Organismus hervorruft. Dazu haben wir früher schon gehört, daß im avitaminösen Organismus die isodynamische Vertretbarkeit der einzelnen organischen Nahrungskomponenten an sich schon im höchsten Grade geschädigt ist (15). Deshalb muß sich bei Avitaminoseversuchen, bei denen neben der Vitaminfreiheit der Nahrung eine einseitige Ernährung besteht, auch die Wirkung dieser einseitigen Ernährung neben der Wirkung des Vitaminausfalles geltend machen. *Will man demnach die Avitaminoseerscheinungen in reiner Form studieren, so muß man bei den Versuchen den Tieren Eiweiß, Fett und Kohlehydrat neben den Salzen in dem Mischungsverhältnis mit der täglichen Nahrung reichen, wie es das normale Tier gewöhnt ist, aufzunehmen. Auf diesen Voraussetzungen basieren meine folgenden Ausführungen in ihren wesentlichen Teilen.*

Von den *anatomischen Veränderungen*, die die Avitaminose im Körper erzeugt, wollen wir bei unserer physiologischen Betrachtung ausgehen. Sie sind das Resultat der Stoffwechselstörungen, die unter dem Vitaminmangel sich einstellen, und die je nach ihrer Dauer und Intensität zu den morphologischen Veränderungen führen. Wir beschränken uns bei dieser Untersuchung nicht nur auf die Anatomie der experimentellen Tieravitaminose, sondern ziehen auch die Sektionsbefunde heran, die man bei Menschen erheben konnte, die an Krankheiten verstorben sind, die unter der Gruppe der menschlichen Avitaminosen zusammengefaßt werden. Das sind vor allem *Beriberi*, *Skorbut*, *Pellagra*, gewisse Formen der *Rachitis* neben einigen anderen.

Das *Gemeinsame* aller bei der Avitaminose beobachteten pathologisch-anatomischen Befunde ist die *Atrophie* und *Degeneration*.

Wir beobachten die Atrophie an der Verminderung des Körpergewichts, an dem Fett- und Muskelschwund, an den Gewichtsabnahmen einzelner Organe, wir sehen die Degeneration an den Entartungen der peripherischen

Nerven, an Veränderungen in den Ganglienzellen, an dem fettigen Zerfall des Herzmuskels. Nur für die skorbutischen und ödematösen Erscheinungen war es lange zweifelhaft, wie man sie zu deuten habe, soweit die letzteren nicht auf einer Herzinsuffizienz beruhten. Aber nachdem die Untersuchungen von *Aschoff* und *Koch* uns darüber belehrt hatten, daß beim Skorbut Veränderungen an der Gefäßwand, die die funktionellen Störungen erklären, bei der mikroskopischen Untersuchung überhaupt nicht nachweisbar sind, konnte es keinem Zweifel mehr unterliegen, daß das Durchlässigwerden der Kapillarwand in Veränderungen der Kittsubstanz zwischen den Endothelzellen gesucht werden müsse, also in Veränderungen, die, jenseits der Sichtbarkeitsgrenze liegend, eine mangelhafte Dichtigkeit dieser Substanz bewirkten. Der Mechanismus des avitaminösen Ödems, das gewöhnlich nicht mit Skorbut vergesellschaftet ist (*Shinoda*), ist noch nicht klargestellt. Jedenfalls treffen wir auch beim Skorbut wieder auf atrophisierende oder degenerative Prozesse; entzündliche Erscheinungen spielen hier ebensowenig eine Rolle, wie bei allen jenen anderen, vorher aufgezählten Zuständen.

Gewiß findet man im Verlaufe der Avitaminose auch gelegentlich, z. B. an den Blutgefäßen des zentralen Nervensystems anatomische Bilder, die vielleicht einen entzündlichen Charakter haben. Es ist ja wohl möglich, daß bei den tief eingreifenden Störungen in den Stoffwechsel, die die Avitaminose macht, auch Produkte entstehen können, die ihrerseits reizend auf einzelne Gewebe einzuwirken und so auch Bilder gelegentlich zu erzeugen vermögen, bei deren Anblick man zweifelhaft sein kann, ob man sie nicht doch bezeichnen muß, als durch entzündliche Vorgänge hervorgerufen (*Kihn*). Aber das sind seltene Ausnahmen. In der *Atrophie* und *Degeneration* — ich wiederhole es noch einmal — haben wir diejenigen morphologischen Erscheinungen, *die in der pathologischen Anatomie der Avitaminose die beherrschende Rolle spielen.*

Aufgabe der *Stoffwechseluntersuchung* ist es nun, das Wesen der avitaminösen Erkrankungen so klarzulegen, daß aus ihm ebensowohl die Funktionsstörungen, die der avitaminöse Organismus darbietet, erklärt werden können, wie auch die anatomischen Organ- und Zellbilder, die zu diesen Funktionsstörungen in genetischer Beziehung stehen, und die bei genügender Intensität und Dauer der letzteren erzeugt werden.

Die *Stoffwechseluntersuchung* bei der Avitaminose stößt nun deshalb auf erheblichere Schwierigkeiten, weil die Avitaminose sich recht häufig mit Störungen in der Verdauung verbindet, die sich teils in Appetitlosigkeit, teils auch in mangelhafter Nahrungsresorption von seiten des Darmkanals äußern, obschon, wie wir feststellen konnten, die *sekretorische Drüsenfunktion* an sich *ungestört erhalten* zu bleiben vermag (29). Das ist erklärlich; denn es kann natürlich der Magendarmtractus ebenso von der avitaminösen Störung befallen werden, wie jedes andere Organ. Atrophie der Darmschleimhaut, häufiger skorbutische Blutungen sehen wir im Magen und Darm, und dann leidet auch die Nahrungsaufnahme und Nahrungsresorption. *Unter diesen Umständen ist die Avitaminose vergesellschaftet mit Unterernährung und einfachem Hunger, und diese beiden komplizieren dann die Stoffwechselstörung,* und es wird schwer, zu unterscheiden, wieweit die beobachteten Veränderungen direkt avitaminösen Ursprungs sind, und wieweit sie einfache Hungererscheinungen darstellen. Das ist eben eine

Eigentümlichkeit der experimentellen Avitaminose, zu deren Erzeugung man die Nahrung *aller* Vitaminfaktoren beraubt, daß sich die Erkrankung bald in diesem, bald in jenem Organ mit besonderer Intensität etabliert (*Shinoda*). Dadurch entsteht eine gewisse *Polymorphie des klinischen Krankheitsbildes*, und gerade beim höheren Tiere ist der Verlauf der Krankheit individuell so verschieden, daß man auch bei Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen bei verschiedenen Individuen derselben Tierart nie zu Versuchsbeginn genau voraussagen kann, welche Krankheitsform man im einzelnen zu erwarten hat.

Für die Beurteilung der avitaminösen Stoffwechselstörung kann man natürlich nur solche Tiere gebrauchen, bei denen im Verlauf der Avitaminose keine Resorptionsstörungen auftreten, oder man kann nur diejenigen Perioden eines Stoffwechselversuchs an einem avitaminösen Tiere zur Beurteilung heranziehen, in denen Unterernährung *nicht* infolge einer Resorptionsstörung in Erscheinung getreten ist.

Eine andere Schwierigkeit in der Stoffwechselerforschung bei der Avitaminose beruht darauf, daß man hierzu im allgemeinen nur größere Tiere, also Hunde, verwenden kann. Bei diesen Tieren dauert aber die Krankheit oft sehr lange, wenn keine skorbutischen Magen- und Darmblutungen dem Leben vorzeitig ein Ende setzen. Eine Krankheitsdauer von zwei, drei, vier, ja mehr Monaten ist nichts Ungewöhnliches. Solche Stoffwechselversuche stellen an die Geduld und Ausdauer des Untersuchers die höchsten Anforderungen, und wenn es mir gelungen ist, in meinem Laboratorium diese Aufgaben durchzuführen, so verdanke ich das vor allem der restlosen Hingabe an diese Arbeit von seiten meiner Mitarbeiter.

Wenn man Hunde nun vitaminfrei mit einer gemischten Nahrung von genügendem Kalorien- und Salzgehalt ernährt, dann kann das *Körpergewicht* entweder von vornherein allmählich abnehmen, oder es kann das Körpergewicht erst nach einer vorübergehenden Zunahme (49) oder nach kürzerem oder längerem Stande auf der ursprünglichen Höhe zu schwinden beginnen, aber eine Abnahme stellt sich doch schließlich so gut wie regelmäßig ein. Vorübergehende Zunahmen in den späteren Stadien der Krankheit sind gewöhnlich durch Ödembildung bedingt. *Harn-* und *Kotmenge* zeigen keine Veränderungen, wenn die Krankheit nicht durch schwere Herzinsuffizienzen oder durch Magen-Darmaffektionen, die dann zu Durchfällen oder gar blutigen Diarrhöen führen, kompliziert ist.

Wir wenden uns nunmehr zunächst dem Verhalten des *Gaswechsels* bei der Avitaminose zu und rühren damit zugleich an den Angelpunkt des ganzen Avitaminoseproblems, soweit es ein physiologisches Problem ist. Wir wollen uns zunächst die Tatsachen vergegenwärtigen.

Am Gaswechsel sieht man — allerdings ist das bisher nur an kleinen Tieren, nämlich an Mäusen, von *Groebbels* beobachtet worden — in der *allerersten Zeit* der avitaminösen Fütterung eine *Steigerung* des Sauerstoffverbrauches, der dann aber eine Herabsetzung nachfolgt. Bei den Hunden, die den typischen Krankheitsverlauf mit sukzessiver Körpergewichtsabnahme beim Fehlen klinisch nachweisbarer Magen-Darmstörung zeigen, kann die Herabsetzung der Oxydation jedenfalls das Krankheitsbild schon von der

zweiten Woche der avitaminösen Ernährung an beherrschen, in der wir die ersten Gaswechselbestimmungen gemacht haben. In dieser Periode der Oxydationsverminderung, die von uns am Hunde (5) und von vielen anderen Autoren (*Ramoino, Abderhalden, Andersen* und *Kulp, Ogata* usw.) an Tauben zunächst nur durch die Untersuchung am *nüchternen* Individuum festgestellt wurde, besteht aber auch, was mir Versuche an Ratten gezeigt haben (41), *bei der Nahrungsaufnahme, also in der Verdauungsperiode*, eine *Herabsetzung des Sauerstoffverbrauches* im Vergleich zur Norm. Daraus ergibt sich, daß die *Oxydationsverminderung bei der Avitaminose durchgängig zu jeder Tageszeit vorhanden ist* bei den Tieren, wenn man den Normalzustand zum Vergleiche heranzieht. Die Kohlensäureabgabe ist ebenfalls vermindert und der respiratorische Quotient herabgesetzt.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden stehen die Beobachtungen von *Shinoda*, der feststellte, daß die überlebenden Leberzellen von avitaminösen Hunden in vitro nach Zusatz von thermostabilen vitaminhaltigen Extrakten — es handelte sich um Vitamin B — eine Steigerung ihrer oxydativen Fähigkeiten erkennen lassen.

Mit der Herabsetzung der Oxydationen geht eine *Erniedrigung der Körpertemperatur* einher, die besonders in den späteren Stadien der Krankheit recht ausgesprochen sein kann.

Die fortschreitende Verminderung der Oxydation, die sich bei gleichzeitig sinkendem Körpergewicht einstellt — womit nicht gesagt sein soll, daß ein genauer Parallelismus zwischen beiden Phänomenen obzuwalten braucht —, erinnert an die Verhältnisse, wie wir sie bei einfacher Unterernährung mit vitaminreicher Nahrung sehen. Bei der Unterernährung liegen die Dinge klar; hier nimmt die Körpersubstanz ab, und die respiratorische Protoplasmafläche verkleinert sich durch die Zersetzungen beim Lebensprozeß und der Funktion, weil nicht genügend Ersatzmaterial aus dem Darme zugeführt wird. So muß auch der Sauerstoffverbrauch dementsprechen zurückgehen. *Bei der Avitaminose aber beobachten wir die Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs und die Verminderung des Körpergewichtes auch dann, wenn eine für den Körper kalorisch suffiziente Nahrung quantitativ resorbiert wird* (5) (6). Gerade darauf haben wir unsere besondere Aufmerksamkeit gerichtet und haben durch genaue Kontrolle der Trockensubstanz und des Stickstoffgehaltes des Kotes festgestellt, daß die Resorption ungestört verlief, während das Körpergewicht sank und der Sauerstoffverbrauch sich verminderte. Wir haben auch gesehen, wie in einem Falle von Hypovitaminose unter solchen Bedingungen eine kleine Zulage von Vitamin in der Form frischen Citronensaftes sofort den Sauerstoffverbrauch steigerte (37) (55), den Körpergewichtsabfall zum Stehen brachte, die negative Stickstoffbilanz rasch positiv werden ließ, ohne daß sonst in der Nahrungsmenge und -zusammensetzung irgend etwas geändert wurde. Die Resorption war ausweislich der Trockenkotmengen und des Kotstickstoffgehaltes vor und nach der gesteigerten Citronenzulage dieselbe. Im Durchschnitt wurden bei diesem Hunde (37) an

18 Tagen vor der Citronensaftzulage täglich 5,58 g Trockenkot mit 0,0427 g N und an den ersten 18 Tagen nach der Citronenzulage 5,40 g Trockenkot mit 0,0395 g N produziert.

Ich habe mich aber mit der Trockenkotbestimmung und der Ermittlung der Stickstoffresorption bei avitaminösen und hypovitaminösen Hunden nicht begnügt, sondern in einem neuen Versuche neben diesen Analysen auch noch die Verbrennungswerte für den Kot in verschiedenen Perioden der Avitaminose selbst bei vorangeschrittener Krankheit untersuchen lassen (6). Hierbei ergab sich, daß der Kaloriengehalt der täglichen Kotmenge in den Perioden der progressiven Körpergewichtsabnahme mit immer mehr sich verstärkender negativer N-Bilanz sogar wesentlich abnahm. Die Werte waren folgende: Vom 5. bis 7. Versuchstage enthielt der tägliche Kot 47 Cal., vom 49. bis 56. Versuchstage 35 Cal., vom 57. bis 63. Versuchstage 27 Cal. In dieser letzten Periode war bei stark gesunkenem Körpergewicht die N-Bilanz negativ, und das Tier litt an schweren Lähmungserscheinungen der Extremitäten. Es starb am 68. Versuchstage an seiner Avitaminose. *Ich habe überhaupt den Eindruck, daß mit fortschreitender Avitaminose die Nahrung immer vollkommener resorbiert wird*, wenn keine Magen-Darmstörung als zufällige Komplikation vorliegt.

Alles das zeigt zur Genüge, daß das beobachtete Phänomen der *Verminderung des Sauerstoffverbrauchs ein primär avitaminöses Symptom ist*, das nichts mit einer Resorptionsstörung im Darmkanal, also mit echter Unterernährung oder einfachem Hunger zu tun hat. Führt die Avitaminose aber in einzelnen Fällen zu einer Resorptionsstörung dadurch, daß sich eine avitaminöse Alteration des resorbierenden Darmepithels im Verlaufe der Krankheit bei einzelnen Individuen einstellt, dann *gesellt sich die Unterernährung hinzu* (6), *und ihre Folgeerscheinungen sind dann am Gaswechsel und in der Beeinflussung des Körpergewichtes die nämlichen*, wie wir sie vorhin als primär avitaminöse Störungen kennengelernt haben. Dann addieren sich die beiden Störungen, echter Hunger kommt zu Avitaminose und die Krankheit nimmt einen beschleunigten Verlauf. Fast durchgängig ist dies der Fall in der allerletzten, prämortalen Periode der Krankheit (5) (6), die aber nur wenige Tage dauert.

Die initiale Oxydationssteigerung, die darauf folgende, Wochen, ja Monate bestehende Oxydationsherabsetzung, die bald mehr, bald weniger ausgesprochene progressive Körpergewichtsabnahme, die allmähliche Erniedrigung der Körpertemperatur, die die Oxydationsverminderung begleitet, und das Auftreten aller dieser Erscheinungen bei der Zufuhr und der ungestörten Resorption einer kalorisch suffizienten Nahrung, das alles kann nur durch tiefgreifende Störungen im Stoffwechsel der organischen Substanz zustande kommen. *Diese Störungen müssen wir erst kennenlernen, bevor wir den Versuch wagen dürfen, den Widerspruch in den beobachteten Erscheinungen zu erklären, der darin besteht, daß trotz genügender Nahrungsresorption diese Nahrung*

nicht nur umgesetzt wird, sondern daß der Körper auch obendrein seine Eigensubstanz, die er in die Avitaminose mit hineinbringt, verzehrt, und daß er das alles tut, ohne daß die Oxydation in toto gesteigert ist, wenn wir von dem kurzfristigen initialen Stadium ihrer Steigerung absehen.

Wir wenden uns zunächst der Betrachtung des *Stickstoffwechsels* zu (1) (5) (6) (49).

Oft schon nach den ersten Tagen der avitaminösen Ernährung, in anderen Fällen in späterer Zeit, beginnt die Stickstoffausscheidung im Harn zu steigen, und die N-Bilanz kann schließlich stark negativ werden. Es gibt Hunde, besonders ältere Tiere, die überhaupt schwerer an Avitaminose erkranken als jüngere (6), und bei denen die gesamte N-Bilanz sehr lange Zeit ohne Veränderung auf ihrer ursprünglichen normalen Höhe stehen bleibt. In den ersten Wochen der Avitaminose ist überhaupt vielfach sogar noch ein N-Ansatz möglich. Bei diesen Tieren zeigt auch das Körpergewicht dann gewöhnlich keine erheblichere Verminderung. In den typischen Fällen aber geht mit der Senkung des Körpergewichtes auch das mehr und mehr Negativwerden der N-Bilanz konform. Nur in den allerletzten Stadien der Avitaminose beobachtet man gelegentlich wieder eine vorübergehende N-Retention (5), der dann aber, vielleicht nach einer nochmaligen Senkung der N-Bilanz, der Tod nachfolgt. Hier haben wir es zweifellos mit Ausscheidungsstörungen zu tun und nicht mit einem neuerlichen N-Ansatz.

Wir haben nun auch die *Verteilung der einzelnen N-haltigen Bestandteile im Harn* mit der Absicht untersucht, festzustellen, *ob mit der quantitativen Steigerung des N-Umsatzes qualitative Veränderungen bei demselben nachweisbar wären* (6) (22). Bei diesen Versuchen, die an mehreren Hunden zur Durchführung gelangten, wurde der gesamte Stickstoff, der Harnstoff, das Ammoniak, die Aminosäuren, das Kreatinin, wie die Harnsäure und das Allantoin bestimmt. Natürlich wurden immer an ein und demselben Tiere alle diese Analysen gleichzeitig gemacht. Das Ergebnis dieser langwierigsten und mühevollsten unserer Untersuchungen, die von *Joshiue* (6) durchgeführt wurden, war folgendes. Wenn die gesamte N-Bilanz anfängt, der Negativität zuzustreben und die gesamte N-Ausscheidung ansteigt, wächst die prozentige Harnstoffquote des Gesamtstickstoffs an. Ammoniak- und Aminosäureausscheidung verlaufen im allgemeinen parallel. Ihre absoluten Mengen steigern sich, aber das Verhältnis von Harnstoff zu Ammoniak bleibt normal. Nur in der prämortalen Periode nimmt der Harnstoff zugunsten des Ammoniaks ab; es entsteht eine Acidosis. Wenn diese in früheren Stadien auftritt, ist sie immer durch eine Resorptionsstörung bedingt.

Jedenfalls kommt es bei der Avitaminose schließlich, und zwar bei *ungestörter Nahrungsresorption und bei der Resorption einer Kalorien- und Stickstoffmenge, die, auf das Körpergewicht berechnet, für den normalen Körper genügend wäre, zu einer Acidosis* im prämortalen Stadium. In früheren Stadien ist auch eine *Herabsetzung im Kohlensäuresättigungsvermögen des Blutes*, gemessen nach der *van Slyke*schen Methode, *niemals nachweisbar* (27), was immer bei der Anwesenheit größerer Säuremengen im Blut und Harn der Fall ist. Auch der Gehalt des Blutes an Gesamtaceton und β-Oxybuttersäure war niemals verändert (46), und im Harn ließen sich diese Körper niemals auffinden, so sehr wir auch danach fahndeten.

Wenn man ein Tier während des ganzen Avitaminoseversuchs immer mit der gleichen Nahrung ernährt, dann steigt also im Laufe

der Krankheit zunächst nur die prozentische Harnstoffquote, erst ganz zuletzt folgt der Anstieg der prozentischen Ammoniak- und Aminosäurenquote, wobei die Größe der prozentischen Harnstoffquote zurückgeht, aber schließlich sind jedenfalls alle Quoten in bezug auf ihre absoluten Größen erhöht im Vergleich zur Norm, und die gesamte N-Menge des Harns ist gesteigert.

Sobald aber die Avitaminose sich mit einer Resorptionsstörung im Darme vergesellschaftet und sich so mit Unterernährung kompliziert, dann wird das Harnbild ganz von der Unterernährung beherrscht. Die Ammoniakquote ist auf Kosten der Harnstoffquote sehr hoch, ebenso die Aminosäurequote. Im prämortalen Stadium kann aber die Acidosis auch nicht mehr durch gesteigerte Nahrungszufuhr und Resorption gebessert werden, wenn die Resorption noch leidlich ungestört verläuft, was nur ausnahmsweise der Fall ist. Hier ist auch das Kohlensäuresättigungsvermögen des Blutes herabgesetzt (27). Wenn man in anderen Perioden der Avitaminose eine derartige Acidosis findet, dann kann man sicher sein, daß gleichzeitig eine Unterernährung infolge einer Resorptionsstörung vorliegt.

Harnsäure- und Allantoinausscheidung gehen teils parallel, teils divergieren sie (45). Eine *Vermehrung der Harnsäureausscheidung* wird nur bei länger dauernder Krankheit in den späteren Stadien beobachtet. Auf das Körpergewicht berechnet, kann dann die *Vermehrung der Ausscheidung der endogenen Harnsäure recht beträchtlich sein* (45). Die *leichteren* Grade der Zelleiweißzersetzung führen also bei der Avitaminose noch *nicht zum Kernzerfall,* sondern *nur zur Einschmelzung des Protoplasmas.* Das haben wir auch *histologisch* nachweisen können, daß die *Kerne* eine besondere *Resistenz* gegenüber der avitaminösen Störung aufweisen (48). Mangelhafte Nahrungsresorption ist nicht die Ursache der Harnsäurevermehrung bei der Avitaminose. Die Harnsäurevermehrung ist hier keine Hungererscheinung schlechthin. Denn beim Hunger tritt die Harnsäurevermehrung erst nach längerer Nahrungskarenz auf, und wir haben gesehen in zwei Fällen bei Hunden, die schon nach wenigen Wochen der Krankheit an skorbutischen Darmblutungen zugrunde gingen und an Störungen in der Nahrungsaufnahme litten, daß die Harnsäureausscheidung normal blieb (45).

Auch das Verhältnis des *Schwefels* zum Stickstoff zeigt im Harn avitaminöser Hunde *keine* Veränderungen im Vergleich zur Norm (11). Im Verhältnis zum gesamten N des Harns war der *Gesamtschwefel* und *Neutralschwefel,* der ja den mangelhaft oxydierten Teil des Schwefels darstellt, immer von normaler Menge, woraus sich ergibt, *daß die Oxydation am schwefelhaltigen Komplexe des Eiweißmoleküls in qualitativ normalen Bahnen verläuft.*

Endlich sei hier erwähnt, daß der Gehalt des Harns an *flüchtigen Fettsäuren* selbst im Zustande schwerster Avitaminose am Hunde von uns *normal* gefunden wurde (11), was gegen das Vorhandensein von Darmstörungen spricht.

Noch ein Wort zur *Kreatinausscheidung* sei hier gesagt! *Palladin* hatte bei skorbutischen Meerschweinchen von Anfang der Krankheit an eine Kreatinvermehrung im Harn beobachtet; *Shinoda* stellte sie besonders dann bei Hunden fest, wenn spastische Zustände in der Muskulatur herrschten. Die Beziehung des Kreatinstoffwechsels zum Muskeltonus ist bekannt. Also auch das Kreatin nimmt an der allgemeinen Erhöhung des N-Stoffwechsels teil.

Diese Untersuchungen über das Verhalten des Harnstickstoffs und der Verteilung seiner Komponenten bei der Avitaminose findet ihre Ergänzung in der Untersuchung des *Blutstickstoffs* (28).

Der *Reststickstoff des Blutes* zeigt bei fortschreitender Avitaminose eine leichte Steigerung, es ist aber auffallend, wie lange er gerade beim Hunde normal bleiben kann. Der *Aminosäuregehalt des Blutes* wächst im allgemeinen bei der Avitaminose sehr langsam. Nur in den späteren Stadien der Krankheit zeigt er eine stärkere Vermehrung. Die Veränderungen im *Harnstoffgehalt* des Blutes sind unbedeutend. Er bleibt im allgemeinen normal und vermehrt sich erst gegen Ende der Krankheit ein wenig. Nur wenn die Avitaminose mit Resorptionsstörungen oder überhaupt echtem Hunger kompliziert ist, ist die Vermehrung des Reststickstoffs und besonders der Aminosäuren beträchtlicher.

Das *allgemeine Ergebnis* dieser Untersuchungen am *Stickstoffstoffwechsel* können wir folgendermaßen zusammenfassen. Die Störungen im Stickstoffstoffwechsel sind in der ersten Zeit der Krankheit im allgemeinen verhältnismäßig gering, erst in den späteren Stadien nehmen sie größeren Umfang an. Es zeigt die absolut gesteigerte N-Ausfuhr den verstärkten Eiweißzerfall an; unsere Untersuchungen über die Zusammensetzung des Harnstickstoffs hinsichtlich seiner einzelnen Komponenten haben *keinen Anhaltspunkt für die Annahme gegeben, daß der quantitativ erhöhte Eiweißabbau nicht in qualitativ ungefähr normaler Weise verliefe*. Auch die *harnstoffbildende Funktion der Leber* scheint *keine* irgendwie nennenswerte Beeinträchtigung zu erfahren.

Da zweifellos alle diese Veränderungen im Harne früher und intensiver auftreten als im Blute, so ist der Schluß wohl berechtigt, daß Ausscheidungsstörungen von seiten der Niere für alle diese Substanzen während der Avitaminose im allgemeinen nicht vorliegen, sondern, wie wir früher hörten, sich höchstens in dem Terminalstadium hinzugesellen. Aus der Erfahrung, daß die Ausfuhr endogener Harnsäure erst in den späteren Krankheitsperioden erheblicher gesteigert ist, muß man folgern, daß es auch erst in dieser Zeit zu einem gesteigerten Kernzerfall kommt, während, wie aus der Erhöhung des Aminosäuregehaltes von Blut und Harn hervorgeht und sich überhaupt aus der schon zeitiger eintretenden Negativität der N-Bilanz ergibt, das Protoplasma erheblich früher einschmilzt.

Aber dieser Protoplasmaschwund erklärt die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, von der wir sprachen, nur teilweise, da gemeinhin die Oxydationsverminderung größer ist, als es dem eingeschmolzenen Protoplasma, berechnet aus den negativen Werten der Stickstoffbilanz, entspricht. Somit kann also die *Körpergewichtsabnahme* besonders in den Fällen, in denen sie sich in größerem Maßstabe während der Avitaminose entwickelt, *nicht* durch den *Eiweißzerfall allein bedingt sein;* das weist uns in erster Linie auf eine *größere Fettzersetzung* hin.

Mit dem Fettstoffwechsel ist nun eng verknüpft der *Kohlehydratstoffwechsel*. Wenn wir die Hypothese machen, daß in der Norm alles Nahrungsfett zunächst in den Fettdepots abgelagert, dann je nach Bedarf mobilisiert und darauf wenigstens zum großen Teile in der Leber auf dem Umwege über das Glykogen in Zucker umgebildet wird, um dann erst als solcher den Körperzellen für den Stoffwechsel zugeführt zu werden, dann wird sich unsere Aufmerksamkeit nunmehr zunächst dem Kohlehydratstoffwechsel zuwenden müssen, bei dessen Untersuchung ich mich vor allem der Mitarbeit von *J. A. Collazo* zu erfreuen hatte.

Die Störungen, die wir an dem Kohlehydratstoffwechsel bei der Avitaminose beobachten, können zwar bei verschiedenen Individuen mit verschiedener Schnelligkeit und Intensität sich einstellen, aber im Prinzip sind sie fast immer dieselben. Im Initialstadium der Krankheit zeigt sich eine *Hypoglykämie* (16), an diese schließt sich dann eine *Hyperglykämie* (16), welche mitunter allmählich ansteigt oder aber zu einer gewissen Zeit auch sprunghaft in die Höhe gehen kann. In dem letzteren Falle sind schwere zentrale nervöse Störungen, Lähmungen, Spasmen oder Zwangsbewegungen gar nicht so selten die klinischen Begleiterscheinungen, ohne daß die Hyperglykämie als solche die Ursache dieser Nervensymptome sein kann (19). Kurz vor dem Tode der Tiere geht die Hyperglykämie oft wieder etwas zurück, ohne jedoch, daß der Normalwert des Zuckers wieder erreicht wird (16). Gelegentlich kommt es auch zu einer Glykosurie; Aceton und Acetessigsäure konnte nie im Harn der Hunde nachgewiesen werden.

Die *Leber* ist je nach dem Stadium der Krankheit *glykogenarm oder -frei* (23). Der Muskel scheint dagegen etwas zäher an seinen Glykogenbeständen festzuhalten, wenn diese natürlich auch im Vergleich zur Norm herabgesetzt sind (23). Die Ursache für die Glykogenverarmung der Leber kann eine doppelte sein: entweder könnte die *Glykogensynthese* gestört sein, oder es könnte nur bei vorhandener Synthese das *Stapelungsvermögen der Leber für Glykogen* Not gelitten haben. Sicher wissen wir aus unseren Versuchen (23), daß die *Glykogensynthese* bei der Avitaminose *nicht* erheblicher gestört ist. Denn wenn man avitaminöse Tiere forciert mit Kohlehydrat durch eine einmalige, größere Zuckergabe füttert und in den ersten 4 bis 6 Stunden danach die Leber analysiert, so ist sie glykogenreich. Sie verliert aber dann sehr viel rascher ihr Glykogen wieder als ein normales Tier unter den gleichen Bedingungen. Daraus ergibt sich, daß bei der Avitaminose ein beschleunigter Glykogenzerfall jedenfalls vorhanden ist, daß also das Stapelungsvermögen der Leber für Glykogen vermindert ist. Indessen legen gewisse andere Beobachtungen und Überlegungen doch auch den Gedanken nahe, daß bei der Avitaminose ebenfalls die Glykogensynthese vielleicht eine gewisse Einschränkung erfährt. Ob der Grund hierfür dann in einer Störung der oxybiotischen Zuckerverbrennung, also in der Bildung der Milchsäure aus Zucker, aus der das Glykogen aufgebaut wird, gesucht werden muß, oder ob die Störung in einer anderen Phase des Prozesses angreift, bleibt dahingestellt.

Aus allen diesen Störungen aber ergibt sich ohne weiteres, daß die Toleranz des Körpers gegen Zucker beim avitaminösen Tiere herabgesetzt sein muß. So haben wir denn auch gesehen (18), daß größere

Zuckergaben beim avitaminösen Tiere eine sehr viel länger dauernde Steigerung des Blutzuckers über das Anfangsniveau vor der Zuckergabe hervorrufen als beim gesunden Tiere.

Bei der Betrachtung des Kohlehydratstoffwechsels bei der Avitaminose fällt ohne weiteres die große Ähnlichkeit der Störung mit der diabetischen Stoffwechselstörung auf (3). Ich stehe darum nicht an, zu sagen, daß durch die Avitaminose geradezu eine, wenn auch besondere Art eines Status diabeticus erzeugt wird, und ich werde in dieser Auffassung durch unsere Versuche (4) bestärkt, die zeigen, daß durch *Insulininjektion* beim avitaminösen Tiere nicht nur die Hyperglykämie beseitigt werden kann, nicht nur die mit ihr so oft einhergehenden nervösen Störungen zum Verschwinden gebracht werden können, sondern daß auch die Leber sich wieder mit Glykogen anreichert, während mit dem Abklingen der Insulinwirkung alle früheren Störungen wiederkehren. Das aber lenkt unsere Aufmerksamkeit auf das Verhalten der *Langerhans*schen Inseln bei der Avitaminose. Bei der als Reiserkrankung des Geflügels bezeichneten Sonderform der Avitaminose, die hier mit Schäden einseitiger Kohlehydraternährung vergesellschaftet ist, hat *Ogata* zeigen können, daß die *Langerhans*schen Inseln zunächst hypertrophieren, um erst im Endstadium der Krankheit zu atrophieren. Man hat also durchaus den Eindruck, daß es sich hier um eine kompensatorische Hypertrophie handelt, um eine kompensatorische Überproduktion von Insulin, durch die die vorhandene Störung im Kohlehydratstoffwechsel ausgeglichen werden soll. Und daß das möglich ist, zeigen ja auch unsere Insulinversuche (4). Daß aber die avitaminöse Störung im Kohlehydratstoffwechsel ätiologisch identisch sei mit der diabetischen Störung, also auf einem Insulinmangel beruhe, kann ich darum vorläufig nicht anerkennen. Man muß sich überhaupt hüten, die Störungen an den endokrinen Drüsen als die Ursache der gesamten Stoffwechselstörung bei der Avitaminose anzusprechen und diese Erkrankung etwa so aufzufassen, als sei die Störung dieser Drüsen das Primäre bei der Avitaminose und die Stoffwechselstörung das Sekundäre, das sich aus der Erkrankung der endokrinen Drüsen ergebende Resultat. Denn wenn man die gesamte Literatur über die pathologische Anatomie der endokrinen Drüsen überblickt, so findet man — und das gilt auch für die *Langerhans*schen Inseln — daß die Veränderungen an diesen Drüsen zu inkonstant sind, als daß man ihnen eine solche fundamentale Bedeutung beilegen könnte. Auch die Nebennieren mit ihren etwas regelmäßiger auftretenden Veränderungen sind hierbei nicht ausgeschlossen. Es zeigt sich eben bei den endokrinen Drüsen auch das wieder, was wir schon früher erfuhren, daß nämlich in verschiedenen Fällen bei der Avitaminose in ganz verschiedenem Umfange die einzelnen Organe in Mitleidenschaft gezogen sein können.

Sind endokrine Drüsen bei der Avitaminose stärker erkrankt, dann kann wohl dadurch die gesamte Stoffwechselstörung beeinflußt werden, aber die Erkrankung dieser Drüsen ist nicht ihr letzter Grund; sie kann nur als Teilerscheinung der Avitaminose, koordiniert mit anderen Organerkrankungen und deren speziellen Folgeerscheinungen, gewertet werden.

Auf die von uns (20) (24) (41) beobachtete herabgesetzte Adrenalinempfindlichkeit avitaminöser Tiere sei in diesem Zusammenhang noch verwiesen.

Nach dieser kurzen Abschweifung auf das Gebiet der avitaminotischen Erkrankung der endokrinen Drüsen wollen wir zum *Kohlehydratstoffwechsel* zurückkehren. Die initiale Hypoglykämie, die dann folgende Hyperglykämie, ihre Beziehungen zum Ausbruch gewisser zentraler nervöser Störungen, die Glykogenverarmung der Leber und Muskulatur, die Glykosurie, wie überhaupt die Herabsetzung der Zuckertoleranz des Körpers sind die hervorstechendsten Symptome, die die avitaminöse Kohlehydratstoffwechselstörung kennzeichnet. Wir haben auch schon auf die engen Beziehungen zwischen dem Kohlehydratstoffwechsel und dem *Fettstoffwechsel* hingewiesen. So wollen wir diesen jetzt etwas genauer betrachten. Bei den hierhergehörigen Versuchen war als Mitarbeiter besonders *K. Asada* beteiligt.

Ungefähr parallel mit der Blutzuckerkurve, so konnten wir nachweisen, verläuft die *Blutfettkurve* (21) (26) bei der Avitaminose. Anfangs sehen wir eine leichte Hypolipämie, die dann allmählich einer Hyperlipämie Platz macht (21) (39). Nach der Einschmelzung der Fettdepots in den späteren Stadien wird der Blutfettgehalt wieder normal (39). Der *Gesamtfettgehalt wie auch der Neutralfettgehalt des Körpers* schwindet (38), die Fettdepots werden eingeschmolzen. Welche Nahrung ein avitaminöses Tier auch immer erhalten möge — ich beziehe mich hier auf unsere Versuche (36) (38) an Ratten —, niemals setzt der Körper auf die Dauer Fett an, und es zeigt sich auch hier wieder die Hilflosigkeit des avitaminösen Körpers, indem bei einem Eiweißminimum jede einseitige Ernährung den Körper im Gegensatz zum normalen Organismus fettärmer macht, als eine gemischte Kost.

Eine einmalige verstärkte Fettzufuhr ruft eine im Vergleich zum Versuche am Normaltier protrahierte Erhebung des Blutfettspiegels über das Anfangsniveau hervor (21). Verarmt so während der Avitaminose in jedem Falle der gesamte Körper an Fett, so können doch einzelne Organe im Verlauf der Krankheit darum fettreicher werden. So haben wir gesehen, daß nach einer voraufgegangenen Fettverarmung im vorgeschrittenen Stadium der Avitaminose die Leber fettreicher wird (40), wie das ja gewöhnlich der Fall ist bei langdauernden Lipämien, bei denen sich die Fettdepots allmählich entleeren. Auch das Knochenmark wird in einem gewissen Stadium der Avitaminose fettreicher (13). Bei der Leber muß man aber auch an Degenerationszustände denken, obschon diese ausweislich unserer mikroskopischen Untersuchungen (42) keine erheblichere Rolle spielen.

Endlich wurde von uns die Fettwanderung im avitaminösen Körper unter dem Einfluß der Phosphorvergiftung beobachtet, wobei wir einmal eine stark gesteigerte Empfindlichkeit des Körpers gegenüber der toxischen Phosphorwirkung sahen und außerdem feststellten, daß im Gegensatz zum Normaltier bei dem avitaminösen Tier die Phosphorvergiftung einen sehr stark gesteigerten Blutfettgehalt bewirkt, solange die Fettdepots noch nicht eingeschmolzen sind. Das Leberfett ist dann auch höher als beim Normaltier nach Phosphorvergiftung. Das deutet alles auf eine verlangsamte Fettaufnahme und Fettumsetzung in der Leber hin (39) (40).

Mit dem Fettstoffwechsel geht wiederum parallel der Lipoidstoffwechsel, soweit es sich um den *Cholesterinstoffwechsel* handelt (21) (39). Wir fanden

an Ratten eine Abnahme des Totalcholesteringehaltes des Körpers (38), aber sie ist geringer als die Fettabnahme. Da die Cholesterinabnahme offenbar der Fettabnahme nachhinkt, ist in einzelnen Organen bei der durch den Fett- und vielleicht auch Eiweißverlust bedingten Gewichtsverminderung eine relative Cholesterinvermehrung verständlich.

Über das Verhalten der phosphorhaltigen Lipoide, von denen die wichtigsten, nämlich das Lecithin, sowohl zum Fettstoffwechsel wie zum Phosphorstoffwechsel Beziehung haben, werden wir näheres bei der Betrachtung des Phosphorstoffwechsels hören.

Über das Verhalten der Blut- und Zellfermente, die zum Fett- und Kohlehydratstoffwechsel in Beziehung stehen, haben wir selbst nur wenig Versuche gemacht. Auch die in der Literatur vorliegenden Angaben sind zu widerspruchsvoll, als daß man daraus schon bindende Schlüsse ziehen könnte. So wichtig auch die Kenntnis über das Verhalten dieser Fermente bei der Avitaminose ist, so muß ich aus den genannten Gründen doch darauf verzichten, sie in den Kreis meiner Betrachtung zu ziehen.

Zu der Untersuchung des Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels führten uns die Beobachtungen am Gaswechsel bei der Avitaminose. Wir hörten, daß im Frühstadium der Avitaminose der Sauerstoffverbrauch gesteigert ist. Das erklärt sich jetzt ganz besonders aus der Wahrnehmung, daß zu dieser Zeit Blutzucker und Blutfett abnehmen, also wohl von den Körperzellen in gesteigertem Maße aufgenommen und verbrannt werden. Man hat durchaus den Eindruck, daß wir hier eine überkompensatorische Reaktion des Körpers auf den beginnenden Vitaminmangel und die dadurch gesetzte Stoffwechselstörung vor uns haben. Aber dieses *Reizstadium der Avitaminose*, wie ich es nennen möchte, währenddem es wohl auch noch zu Körpergewichtszunahmen kommen kann, die auf Substanzansatz beruhen, dauert nicht lange. Zwei Phänomene treten auf: die Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs und die Überschwemmung des Blutes mit Zucker und Fett bei Entleerung der Glykogen- und Fettdepots, beides Ausdruck einer gewaltigen Stoffbewegung (*Arnoldi*). Dazu kommt, daß Fett nicht mehr gestapelt, und Glykogen nicht mehr aufgespeichert werden kann.

Zucker und Fettbewegung sind schon im gesunden und erst recht im stoffwechselkranken Organismus eng verbunden. In der Leber haben wir das Organ vor uns, das den Fettstoffwechsel mit dem Kohlehydratstoffwechsel und auch den Eiweißstoffwechsel auf dem Umwege über den Fettstoffwechsel mit dem Kohlehydratstoffwechsel verknüpft.

Während die Fettbildung aus Zucker und wahrscheinlich auch aus Eiweiß bei der Avitaminose ausweislich unserer früher mitgeteilten Versuche im größten Umfange gestört ist (36), wenn das aus dem Fettschwund à tout prix im avitaminösen Körper geschlossen werden darf, scheint umgekehrt die Zuckerbildung aus Fett noch leidlich vollzogen zu werden. Darauf deutet wenigstens die Erfahrung hin, daß bei der Avitaminose die diabetische Acidosis, nämlich die Vermehrung

der β-Oxybuttersäure im Blute vermißt wird (46); dafür spricht auch die Tatsache, daß der avitaminöse Körper geradezu in gesteigertem Umfange eine Fettzerstörung herbeiführt, wie auch endlich der Befund, daß durch eine einmalige verstärkte Fettzufuhr, wie es scheint (23), beim avitaminösen Tiere eine vorübergehende Anreicherung der Leber mit Glykogen erzielt werden kann. Das Fett wandert in verstärktem Maße aus seinen Lagern über das Blut zur Leber. Wir begegnen ihm in der abnorm fettreichen Blutflüssigkeit. In der Leber wird es verbrannt, gemeinsam mit dem Nahrungszucker in Glykogen verwandelt. Wenn es aber zutreffen sollte, daß auch schon die Glykogenisierung bei der Avitaminose Not gelitten hat — für einen verlangsamten Umsatz des Leberfettes sprechen unsere Beobachtungen (39) an phosphorvergifteten avitaminösen Ratten —, dann müßte es auch schon aus diesem Grunde zu einer Fettstauung im Blute kommen, und dann würden beide Faktoren, nämlich die herabgesetzte Glykogenbildung aus Fett mit der nachgewiesenen verzögerten Aufnahme (39) und Umsetzung (40) des Fettes bei Phosphorvergiftung durch die Leber, wie auch der enorme Abfluß des Fettes aus den Depots in das Blut für die Hyperglykämie verantwortlich sein. Es muß aber auch zu einer Zuckerstauung im Blute kommen, wenn die Glykogenbildung aus Zucker herabgesetzt wäre. Da aber das aus Fett und Zucker in der Leber noch gebildete Glykogen sich jedenfalls auch in überstürzter Weise wieder in Zucker zurückverwandelt und dieser ins Blut abströmt, so wird dadurch eine Hyperglykämie erst recht begünstigt.

Diese Hyperglykämie würde aber nicht von Bestand sein können, wenn die Körperzellen das gesteigerte Zuckerangebot auch in entsprechend gesteigertem Maße aufnähmen. Wir haben also allen Grund zu vermuten, daß die Ursache für die Hyperglykämie nicht nur in der allerdings noch fraglichen Verminderung der glykogenbildenden Leberfunktion und in der mit Sicherheit nachgewiesenen Steigerung der das Glykogen in Zucker zurückverwandelnden Leberfunktion gesucht werden muß, sondern daß auch sie zum Teil wenigstens in der Unfähigkeit der Körperzellen begründet liegt, das verstärkte Zuckerangebot in entsprechendem Tempo aufzunehmen und zu konsumieren. Der Gedanke liegt nahe, den Grund für dieses Unvermögen der Körperzellen, den Blutzucker in beschleunigtem Tempo aufzunehmen und umzusetzen, in der nachgewiesenen Verminderung ihres Oxydationsvermögens zu suchen, weil dadurch gewissermaßen auch eine Zuckerstauung in ihnen selbst auftritt.

Trotz dieser ganzen Zuckerstauung im Blute und trotz der Herabsetzung der Verbrennungen, also trotz dieser ganzen Verzögerung des Stoffumsatzes in den Körperzellen werden aber schließlich doch die

Stoffe umgesetzt. Es wird nicht nur das ganze resorbierte Nährmaterial an Eiweiß, Fett und Kohlehydrat (6), sondern es wird auch das Fett der Depots (38), es wird die Protoplasmamasse selbst eingeschmolzen, und es werden die Kerne schließlich abgebaut, wenn sich das zum Teil auch wie beim Zucker und Fett im verlangsamten Tempo vollzieht. So ist es gar nicht anders möglich, als daß sich diese ganzen Umsetzungen abspielen mit einem im Vergleich zur Norm stark verringerten Sauerstoffverbrauch. Da aber auch der respiratorische Quotient bei der Avitaminose sinkt und da, wie sich indirekt aus den Zellatmungsversuchen von *Shinoda* und direkt aus zahlreichen anderen Beobachtungen ergibt, auch die Kohlensäureproduktion herabgesetzt ist, *so können die normalen Endprodukte des Stoffwechsels, soweit sie zur Kohlensäurebildung führen, nicht in dem Umfange bei der Avitaminose erreicht werden wie im normalen Organismus.*

.Die am Gaswechsel gefundene Oxydationsherabsetzung brauchte aber nicht alle Komponenten des Stoffwechsels in gleicher Weise zu betreffen. Wir haben direkt zeigen können, daß leicht oxydable Substanzen, die keine Kohlehydrate sind, nämlich das Natriumacetat, vom schwer avitaminösen Körper in normaler Weise oxydiert werden (11). Wir haben früher schon gehört, daß der Eiweißabbau qualitativ in ungefähr normaler Weise abläuft (6) (11) bei einer quantitativen Erhöhung desselben, und wir müssen daraus schließen, daß in dieser Komponente des Stoffwechsels zum mindesten keine Oxydationsverminderung, sondern im Gegenteil eine Oxydationserhöhung vorliegt. Auch die ganzen Vorgänge am Fettstoffwechsel weisen auf eine Oxydationssteigerung hin. Denn für eine qualitative Störung im Umsatz oder für einen partiellen Umsatz mit dem Auftreten abnormer intermediärer Produkte im Blute haben wir keinen Anhaltspunkt gefunden, mag auch die Fettaufnahme und Fettoxydation von seiten der Leber bei stark gesteigerten Ansprüchen, wie bei der Phosphorvergiftung, etwas verzögert sein.

Daran kann auch eine herabgesetzte Zuckerverbrennung in der Leber die Schuld haben.

Die aus dem Verhalten des N-Stoffwechsels nachgewiesene *Oxydationserhöhung am Eiweiß* und die ebenfalls zweifellos in toto vorhandene *gesteigerte Fettoxydation* muß den *respiratorischen Quotienten erniedrigen*, die aus dem Verhalten des *intermediären Kohlehydratstoffwechsels* sich ergebende *Verlangsamung der Zuckerzerstörung* muß *in gleichem Sinne* wirken. Nun wird aber bei dem *Gesamtumsatz* nicht einfach an Stelle des weniger oxydierten Zuckers entsprechend mehr Eiweiß und Fett oxydiert, *sondern es wird schließlich auch der ganze Zucker in immer der gleichen Menge, wenn auch verzögert, umgesetzt.* Und doch ist trotz des *gesteigerten* Eiweiß- und Fettumsatzes und des

quantitativ immer gleichen und *vollständigen Zuckerumsatzes* die *Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe verringert*. Da nun die Eiweißzersetzung ungefähr in qualitativ normaler Weise vor sich geht, also zum gesteigerten Eiweißumsatz auch ein vermehrter Sauerstoffverbrauch erforderlich ist, und da wir auch im intermediären Stoffwechsel, wenigstens unter den gewöhnlichen Verhältnissen bei der Avitaminose keine Anzeichen für eine Störung in der Fettoxydation auffinden konnten, es sei denn, daß das Fett ein wenig zögernd umgesetzt wird, im Gegenteil eine absolut gesteigerte und restlose Fettumsetzung im Gesamtkörper nachzuweisen vermochten, *muß der Zuckerumsatz mit vermindertem Sauerstoffverbrauch vor sich gehen;* dementsprechend wird auch die Kohlensäureabgabe verringert sein.

Jedenfalls ist trotz des gesteigerten Eiweiß- und Fettzerfalles der Gesamtumsatz, gemessen am Gaswechsel, deutlich herabgesetzt. Das ist in dem vorliegenden Falle der Avitaminose, bei dem die Eiweiß, Fett und Kohlehydrat enthaltende, kalorisch suffiziente Nahrung *quantitativ resorbiert wird*, nur möglich, wenn die *Zuckeroxydation* und die bei ihr entstehende Kohlensäure eine so enorme *Einschränkung* erfährt, *daß dadurch der gesteigerte Sauerstoffbedarf für das Eiweiß und wohl auch für das Fett und die sich hierbei bildende gesteigerte Kohlensäuremenge durch einen gewaltigen Minderverbrauch an Sauerstoff und eine verminderte Kohlensäurebildung beim Zuckerumsatz verdeckt wird*. Ginge der Zuckerumsatz in qualitativ normaler Weise vor sich, dann müßte nach Maßgabe der Beobachtungen am Gaswechsel quantitativ weniger Zucker umgesetzt werden. Das trifft aber bei unserer Versuchsanordnung nicht zu, da alles Kohlehydrat resorbiert wurde und die Störung monatelang beobachtet werden konnte.

Da also der Zucker demnach doch schließlich quantitativ umgesetzt wird, so muß sein Umsatz sich mit vermindertem Sauerstoffverbrauch und verminderter Kohlensäurebildung vollziehen. Es muß demnach der Kohlenstoff des Zuckers entweder im Körper zurückbleiben oder mit dem Harne ausgeschieden werden. Hier hat die Experimentalforschung erneut einzusetzen, wenn das Rätsel der Avitaminose weiter geklärt werden soll. In diesem Zusammenhange mag nicht unerwähnt bleiben, daß *Abderhalden* gelegentlich der Untersuchung einer anderen mit der Avitaminose zusammenhängenden Frage den Kohlenstoffgehalt des avitaminösen Taubenmuskels nicht vermehrt gefunden hat. Untersuchungen über den Kohlenstoffgehalt des Harns bei der Avitaminose sind in meinem Laboratorium in Angriff genommen.

Oxydationssteigerung und Oxydationsherabsetzung sind aber nicht die einzigen reaktiven Störungen, die wir bei der Avitaminose sehen. Vielleicht steht in einem gewissen genetischen Zusammenhang mit der Oxydationsverminderung die von *Abderhalden* festgestellte Ein-

schränkung des *Reduktionsvermögens*, die er an dem Beispiel des Cystins bei der Avitaminose nachweisen konnte. Schließlich laufen ja in der Zelle die Umsetzungen der einzelnen organischen Komponenten nicht getrennt nebeneinander her, sondern sie müssen ineinander greifen in beiden Phasen des Stoffwechsels, in der assimilatorischen wie in der dissimilatorischen. So ist es wohl denkbar, daß die pathologische Oxydationssteigerung am Eiweiß Reduktionsvorgängen an eben derselben Substanz hinderlich ist, und daß dadurch wieder die Bildung intrazellulärer intermediärer Stoffwechselprodukte aus dem Eiweiß gehemmt wird, die ihrerseits wieder auf die Oxydation der Kohlehydrate fördernd hinwirken können (*Abderhalden*).

Diese Beobachtungen und Überlegungen aber deuten zugleich auch darauf hin, daß bei der Avitaminose die gesteigerte Eiweißverbrennung nicht nur konsekutiv und kompensatorisch durch die herabgesetzte Zuckeroxydation ausgelöst zu werden braucht, sondern daß auch Störungen am intrazellulären Eiweißumsatz von einer Feinheit auftreten, die vielleicht die Gesamtbilanz nicht zum Ausdruck bringt, die aber die Herabsetzung der Zuckeroxydation begünstigen können. Beide Vorgänge, die Steigerung der Eiweißoxydation und die Herabsetzung der Zuckerverbrennung vermögen wohl so ineinanderzugreifen, daß ein Circulus vitiosus entsteht, bei dem man dann um so weniger entscheiden kann, an welchem Punkte die avitaminöse Störung primär angreift, als es sehr wohl möglich ist, daß sie sich überhaupt nicht auf einen einzigen Angriffspunkt an einer einzigen Komponente des Stoffwechsels beschränkt.

Jene Fälle experimenteller Avitaminose, die die „*Abmagerungsform*" dieser Krankheit, wie sie *Shinoda* nennt, zeigen, und bei denen, wie wir zum erstenmal feststellten (1) (2) (5) (6), jegliche Störung in der Nahrungsaufnahme und Nahrungsresorption fehlt, können pathologisch-physiologisch gar nicht anders erklärt werden, als wir es hier getan haben. **Sie sind diejenigen, die vor allem unser Interesse verdienen, weil sich hier das Prinzip der avitaminösen Stoffwechselstörung am reinsten offenbart.**

So führt uns die Untersuchung des Stoffwechsels der organischen Substanz bei der Avitaminose zu der wichtigen Erkenntnis, daß die *Assimilation der Nahrung bei dieser Krankheit gestört ist.* Für das Fett schließen wir es aus der Erfahrung, daß sich bei der Avitaminose die Fettdepots entleeren, ohne wieder gefüllt zu werden, und weil die alimentäre Hyperlipämie protrahiert verläuft. Für den Nahrungszucker und den aus dem Fette gebildeten Zucker und damit natürlich auch für allen aus dem Glykogen stammenden Zucker nehmen wir es an, weil die hyperglykämische Kurve beim alimentären Glykämieversuch verzögert abläuft, und weil die Körperzellen das gesteigerte

Zuckerangebot durch das Blut nicht bewältigen. Die Veränderungen am Stickstoffstoffwechsel dagegen könnten nur insofern als eine Assimilationsstörung gedeutet werden, als ein Eiweißansatz jedenfalls in der Avitaminose bei ausgesprochener Krankheit nicht mehr zustande kommt. Dieses Phänomen vermag aber auch in einer Steigerung der *Dissimilation* seinen Grund zu haben. Da wir nun beim Stickstoffstoffwechsel auch in der Vermehrung der Harnstoff- und Harnsäureausscheidung und besonders auch im Endstadium in der Vermehrung der Aminosäuren im Blute und Harne, ohne daß eine schwere Leberinsuffizienz dafür die Ursache sein kann, Anzeichen für einen gesteigerten Eiweißzerfall haben, und da quantitativ die Stickstoffumsetzung immer vermehrt ist, so werden wir annehmen dürfen, daß am Stickstoffstoffwechsel eine Steigerung der Dissimilation vorhanden ist. Die gesteigerte Fettzerstörung weist ebenfalls darauf hin, daß neben der beobachteten Herabsetzung in der Assimilation des Fettes eine erhöhte Dissimilation am Fett obwaltet. Für das Eiweiß aber muß man neben der Dissimilationssteigerung wohl auch eine Assimilationshemmung im Hinblick auf die Beobachtungen über die Wachstumshemmung bei der Avitaminose annehmen.

Da mit dem Wachstum gewöhnlich eine Beschleunigung des Stoffwechsels einhergeht, und da das Wachstum vorzüglich an das Eiweiß geknüpft ist, dürfte die Dissimilationssteigerung im Eiweißstoffwechsel kaum vereinbar sein mit der Wachstumshemmung bei der Avitaminose. Darum nehme ich auch am Eiweiß neben der Dissimilationssteigerung eine Assimilationshemmung an, da mir die erstere in quantitativer Beziehung für die Erklärung der Wachstumshemmung nicht zu genügen scheint.

Von der gewöhnlichen Unterernährung unterscheidet sich die avitaminöse Assimilationsstörung dadurch, daß bei jener den Zellen zu wenig Nährmaterial angeboten wird, und daß ihnen deshalb die Gelegenheit zur Assimilation weitgehend fehlt, während bei der Avitaminose ein genügendes Angebot von Nährmaterial vorhanden ist, die Körperzellen aber — um mich kraß auszudrücken — nichts rechtes damit anfangen können. Sie hungern inmitten eines Überflusses, weil sie entweder zu wenig assimilieren oder das Assimilierte zu rasch wieder zersetzen. Ich habe diesen Zustand als den avitaminösen Zellularhunger bezeichnet (1). Bei der Unterernährung ist die Oxydation herabgesetzt infolge des Mangels an Brennmaterial. Bei der Avitaminose aber hat die Zelle die Fähigkeit verloren, eine bestimmte Quote des Feuerungsmaterials, nämlich das Kohlehydrat, vollständig zu verbrennen. Hier ist die Oxydationsstörung im Gegensatz zum Hunger und der Unterernährung die primäre Störung, wie aus den Beobachtungen über die Steigerung der Oxydationskraft der Organzellen avitaminöser Tiere durch Vitaminzusatz direkt hervorgeht.

Wenn wir nun sehen, daß der Kohlehydratstoffwechsel bei der Avitaminose sich mit einem verminderten Sauerstoffverbrauch vollzieht, und daß die normalen Endprodukte nicht in normalem Umfange erreicht werden, dann liegt der Gedanke nahe, worauf ich auch schon früher hinwies, *daß die avitaminöse Stoffwechselstörung nicht nur eine quantitative, sondern auch eine von dem normalen Umsatz qualitative Abweichung aufweisen wird.* Wir werden annehmen dürfen, daß gerade im intermediären Kohlehydratstoffwechsel Produkte entstehen, die im normalen Körper nicht vorkommen oder, wenn sie vorkommen, doch sofort wieder umgewandelt werden. Einen Anhaltspunkt für diese Auffassung geben uns Beobachtungen am Kohlehydratstoffwechsel, auf die ich hier noch etwas näher eingehen muß.

Wir haben früher schon gehört, daß gewisse akute spontane Steigerungen der Hyperglykämie (*Shinoda*), und ich muß hier noch anfügen, daß dasselbe auch bewirkt werden kann durch akute stärkere perorale Zuckerzufuhr (19) (35), ja daß überhaupt durch eine dauernde stark kohlehydrathaltige Nahrung der Ausbruch gewisser akuter nervöser Reiz- und Lähmungserscheinungen hervorgerufen wird, die ebensowohl durch rasche Vitaminzufuhr wie durch Insulininjektion (4) ebenso schnell zum Verschwinden gebracht werden können, wie sie spontan entstanden oder ad hoc erzeugt worden sind.

Hier kann es sich nur um toxische Wirkungen von Substanzen handeln, die im avitaminösen Organismus im Zusammenhang mit der Kohlehydratumsetzung gebildet werden. Hier haben wir ein Beispiel, das uns zeigt, daß der avitaminöse Körper aus Bestandteilen der normalen Nahrung Giftstoffe in einem Umfange bildet und diese in Zirkulation setzt, wie es niemals der normale Körper tut.

Aus der von uns entwickelten Auffassung des *Charakters der avitaminösen Stoffwechselstörung als einer Störung, die in einer Herabsetzung der Assimilation, verknüpft mit einer Steigerung der Dissimilation, besteht, lassen sich alle anderen Erscheinungen erklären,* die der avitaminöse Körper, abgesehen von den geschilderten Stoffwechselvorgängen, sonst noch darbietet.

Ich erinnere hier in erster Linie an die seit langem bekannten Erscheinungen der Wachstumshemmung, aber auch die von uns gefundenen Verzögerungen in der Heilung von Haut- (14) und Knochenwunden (56), die Störungen in der Bindegewebsregeneration (14), die Verzögerung in der Resorption von Blutextravasaten (56) gehören hierher. Nun verstehen wir auch, warum atrophische und degenerative Erscheinungen den pathologisch anatomischen Befund bei der Avitaminose beherrschen. So läßt sich auch die Störung der Spermatogenese und Ovulation (48) und die verminderte Fruchtbarkeit avitaminöser Tiere erklären, so lassen sich die Störungen in der Blutneubildung (33), läßt sich die avitaminöse hypochrome Anämie (33), die Umwandlung des roten Knochenmarks in gelbes Fettmark (13), das Auftreten der skorbutischen Blutungen deuten, so läßt es sich

endlich auch verstehen, warum wir im Experiment sahen, daß avitaminöse Tiere bei körperlichen Anstrengungen viel rascher schweren Lähmungen und dem Tode verfallen, als normal ernährte Tiere bei gleichen Anforderungen (8). Alles was die Dissimilation im Körper erhöht, mag es sich um die gesteigerte Arbeitsleistung der Skelettmuskulatur (8) oder, wie uns andere Versuche belehrt haben, um die Zufuhr von Salzen (31) (32), wie z. B. von Jodverbindungen handeln, die dissimilationssteigernd wirken, muß gleichsinnig mit der einerseits daniederliegenden Assimilation und der andererseits erhöhten Dissimilation bei der Avitaminose arbeiten und zu einem rascheren Dahinsterben der Tiere führen. Wir fanden aber auch, daß Arsen die avitaminöse Wachstumshemmung nicht kompensiert (32).

Es hat dabei einen besonderen Reiz, zu hören, daß wir bei den Versuchen über therapeutische Beeinflussung einzelner avitaminöser Symptome durch Mittel, die nichts mit Vitaminen zu tun haben, feststellen konnten, daß die Bestrahlung avitaminöser Tiere mit ultraviolettem Licht die Ausbildung der avitaminösen Knochenmarksveränderungen, nämlich die Fettmarkbildung, verhindert (13) und auch das Entstehen der avitaminösen Anämie hintenanzuhalten scheint (34). Wie weit dabei die Einatmung der ozonreichen Luft beteiligt ist, muß noch untersucht werden.

Die Beobachtungen am Blutbilde, die uns das Auftreten einer hypochromen Anämie bei der Avitaminose kennenlehrten (33), wie auch die längst bekannten Erfahrungen über die der Rachitis ähnlichen avitaminösen Knochenveränderungen sind es, die uns veranlaßten, neben dem Studium des Stoffwechsels der organischen Substanz auch demjenigen der *anorganischen Salze* bei der Avitaminose unsere Aufmerksamkeit zuzuwenden.

So fanden wir, daß der jugendliche (7), wie auch der erwachsene Körper (9) bei der Avitaminose eine Herabsetzung in der *Eisenassimilation* zeigt. Das gleiche gilt für den *Kalk* (30). Der *organische Phosphor* (10) (12) (43) (44), soweit er als Lecithin vorhanden ist, nimmt ab zugunsten des *übrigen Phosphors*. Eine Lecithinmast der Leber, die bei normalen Tieren wohl möglich erscheint, ist bei der Avitaminose nicht mehr zu erzielen (43). Der *Gesamtphosphor* vermindert sich bei der Avitaminose vor allem im Verhältnis zum Schwunde der Weichteilmassen des Körpers (7) (10) (12); das Skelett nimmt daran unter Berücksichtigung seines enormen Phosphorgehaltes weniger teil. Wenn im Frühstadium der Avitaminose es noch zu einer Stickstoffretention kommt, dann geht damit auch eine Verminderung der Phosphorausscheidung einher (49), woraus geschlossen werden darf, daß es sich hier wirklich um Eiweißansatz handelt. Schmilzt aber bei der Avitaminose Körpereiweiß ein und verliert der Organismus damit auch Phosphor, so behält das im Körper zurückbleibende Protoplasma auf die Trockensubstanz berechnet seinen normalen Phosphorgehalt (12). Auch daraus ergibt sich, was ich vorhin schon sagte, daß bei der Avitaminose keine isolierte Störung im Sinne einer Phosphorverarmung des Körpers besteht, sondern daß der Phosphorabbau mit dem Protoplasmaabbau konform geht.

In diesem Zusammenhang will ich noch erwähnen, daß wir am prozentigen Lecithin und Kephalingehalt des avitaminösen Gehirns keine nennenswerten Veränderungen gefunden haben (44). Andere Organe werden, wie gesagt, stärker prozentig ärmer an Lecithin. Der Lecithingehalt des Blutes ist wohl etwas vermindert.

Überhaupt scheint es bei der Avitaminose zu lebhafteren Störungen im *Mineralstoffwechsel* nur dann zu kommen, wenn die Krankheit so weit vorgeschritten ist, daß auch der gesteigerte Eiweißzerfall sich eingestellt hat. So konnten wir im Anfang der Avitaminose bei noch vorhandenem Eiweißansatz auch noch eine Kalk- und Magnesiumretention beobachten (49).

Noch einige Bemerkungen über den Wassergehalt (10) (12) des avitaminösen Körpers mögen unsere Betrachtungen beschließen. Der Wassergehalt des Gesamtkörpers kann normal bleiben. Mitunter sehen wir aber auch, daß einzelne Organe eine leichte Vermehrung des Wassergehaltes zeigen, in anderen Fällen ist sie stärker. Wir haben ja auch schon von dem Auftreten des avitaminösen Ödems gehört, und auch davon, daß gelegentlich infolge einer avitaminösen Herzinsuffizienz hydropische Erscheinungen sich einstellen können. So lassen sich über den Wassergehalt des avitaminösen Körpers keine allgemein gültigen Angaben machen, man kann nur so viel sagen, daß die Avitaminose als solche zu keiner Störung desselben führen muß, daß aber häufig eine sehr geringfügige Erhöhung im Wassergehalt einzelner Organe gefunden wird, und daß stärkere Störungen immer bedingt sind durch ganz besondere, nur für den jeweiligen Fall zutreffende Verhältnisse.

Unsere ganzen bisherigen Ausführungen beruhten auf der Voraussetzung, daß die Nahrung *vollständig vitaminfrei* sei. Wie sich die Stoffwechselstörungen verhalten, wenn nur ein Vitamin fehlt und die anderen Faktoren vorhanden sind, darüber wissen wir vorerst nur wenig. Wir kennen die Bedeutung des Faktors A und des Faktors B für das Wachstum, wir wissen, daß das Vorhandensein des Faktors A auch das Auftreten jener der Rachitis ähnlichen Knochenveränderung verhütet. Er hat auch Beziehungen zur Fettassimilation (26). Sicher bestehen zwischen dem Faktor B und dem Kohlehydratstoffwechsel besonders enge Beziehungen, wie *Ogata* nachwies. Wir selbst fanden (7), daß das Vitamin C und auch das Vitamin B besondere Bedeutung für die *Eisenassimilation* haben. Die den Skorbut verhindernde Funktion des Faktors C ist bekannt. Aber unser Wissen über alle diese Wirkungen der einzelnen Vitaminfaktoren ist heute nicht mehr denn Stückwerk. Was uns not tut, ist die systematische Erforschung des Stoffwechsels bei kalorisch suffizienter Nahrung, die auch sämtliche Komponenten an Eiweiß, Fett und Kohlehydraten und Salzen in dem dem Körper adäquaten Mischungsverhältnis besitzt, bei der aber ein einzelner Vitaminfaktor bei genügendem Vorhandensein aller anderer fehlt. Und bei diesen Versuchen müssen Resorptionsstörungen natürlich ausgeschlossen sein. Erst wenn diese Arbeit getan sein wird, werden wir uns auch ein Bild von dem Zusammenwirken der verschiedenen Vitaminfaktoren im tierischen und menschlichen Organismus machen können.

Nun hat uns aber jetzt schon die Erfahrung gelehrt, daß nicht alle Tiere in gleichmäßiger Weise alle Vitaminfaktoren wenigstens für

den Fortbestand ihres Lebens bedürfen. Es scheint, daß die Gewebe verschiedener Tiere eine verschiedene Empfindlichkeit gegenüber dem Mangel einzelner Faktoren besitzen (56). So wissen wir, daß die Vögel auf das Fehlen des Faktors B mit sehr viel stürmischeren Krankheitserscheinungen reagieren als andere Tiere, daß Meerschweinchen gerade das Fehlen des Faktors C in höchstem Maße erkranken läßt. Der Mangel der anderen Faktoren ist bei diesen Tieren gewiß nicht irrelevant, denn auch bei Tauben ruft der Mangel am Faktor C skorbutische Blutungen hervor; aber bei Meerschweinchen verläuft der Skorbut, den der Mangel an C-Vitamin auslöst, unendlich viel stürmischer als beim Geflügel. So sehen wir, ist die Widerstandskraft einzelner Gewebselemente bei verschiedenen Tieren dem Fehlen eines bestimmten Vitaminfaktors gegenüber eine außerordentlich verschiedene. Und die Versuche am Hunde haben uns dazu gezeigt, daß auch beim Fehlen aller Vitaminfaktoren bei im übrigen gleichen Versuchsbedingungen eine große *Polymorphie des klinischen Krankheitsbildes* möglich ist, was uns zeigt, daß auch die einzelnen Gewebe bei derselben Tierart eine individuell außerordentlich große Verschiedenheit gegenüber der Einwirkung der gleichen krankmachenden Ursache erkennen lassen.

Ich komme zum Schluß. Das Studium der pathologischen Physiologie der Avitaminose macht es offensichtlich, daß Vitaminmangel in der Nahrung beim Menschen Krankheitszustände hervorrufen muß, die prinzipiell mit denjenigen identisch sind, die wir experimentell im Tierversuch erzeugen konnten. Man hat auch vielfach beim Menschen experimentell avitaminotische Störungen bewirkt und dabei gesehen, daß die Erscheinungen mit denjenigen der experimentellen Tieravitaminose weitgehend konform verlaufen. Das tiefere Verständnis der avitaminösen Störung aber haben uns erst unsere Stoffwechselversuche am höheren Tiere gebracht, bei denen alle Anforderungen, die man an solche Experimente stellen muß, aufs strengste erfüllt waren, und über die ich im Laufe meiner Ausführungen berichtete.

Die Polymorphie der klinischen Erscheinungen, die uns im Tierversuch entgegentritt, beobachten wir erst recht beim Menschen. Dazu kommt noch, daß bei den menschlichen Avitaminosen oder Hypovitaminosen die avitaminöse Störung häufig kompliziert ist mit den Schädigungen einer einseitigen Ernährung, und daß hier auch die Krankheit gar nicht so selten durch den vorwiegenden Mangel eines einzelnen Vitaminfaktors herbeigeführt wird. Außerdem vermag beim Menschen die Symptomatologie der Avitaminose beeinflußt zu werden durch äußere Einwirkungen, durch Lebensgewohnheiten, durch berufliche Schädigungen, durch das Lebensalter und gewiß noch durch manche andere Momente, die wir heute nicht übersehen. Gerade unsere Beobachtungen über den kompensatorischen Einfluß der Belichtung

des Körpers auf die Entwicklung avitaminöser Schädigungen, wie unsere Beobachtungen über die Verstärkung avitaminöser Erscheinungen durch bestimmte Arbeitsleistungen machen es ganz klar, wie allgemeine Lebensbedingungen und Gewohnheiten verzögernd und beschleunigend auf den Ablauf der Avitaminose im allgemeinen und bestimmend auf den Ausbruch und die Lokalisation einzelner Symptome einzuwirken vermögen. Kann es uns da noch wundern, wenn wir hören, daß beriberikranke Handarbeiter in Japan vor allem Lähmungen an den Armen, beriberikranke Beinarbeiter aber vor allem Lähmungen an den Beinen zeigen? Kann es uns erstaunen, daß unter Schulkindern, die unter dem Einfluß einer hypovitaminösen Ernährung stehen, gerade die fleißigsten, die viel hinter den Büchern hocken und lesen, auch besonders für Sehstörungen bei der Beriberi prädisponiert sind, wie mir von japanischen Kollegen berichtet wurde?

Es würde mich zu weit führen, wollte ich den Versuch machen, an der Hand der Symptomatologie der einzelnen zu den Avitaminosen gezählten Krankheiten, der Beriberi, der Pellagra, des Skorbut, der Rachitis, der Ödemkrankheit, der Sprue und anderer mehr zu analysieren, was an den beobachteten Erscheinungen bei jeder einzelnen auf den Vitaminmangel zurückzuführen ist, das Fehlen welcher Vitamine in Frage kommt, und wie andere krankmachende Ursachen an dem Aufbau der speziellen klinischen Krankheitsbilder beteiligt sind. Es würde die Durchführung eines solchen Versuchs auch scheitern müssen, weil die hierzu notwendigen kritischen Vorarbeiten noch nicht genügend weit gediehen sind. So begnüge ich mich mit diesen allgemeinen Hinweisen.

Die Erfahrungen, die wir selbst in Deutschland, und die mit uns in noch ausgedehnterem Maße Österreich während der Hungerblockade des Weltkrieges über den Vitaminmangel der Nahrung auf die allgemeine Volksernährung und insbesondere auf die Entwicklung und die Gesundheit der heranwachsenden Jugend gemacht haben, sind uns allzu frisch in der Erinnerung, als daß ich darüber viele Worte zu verlieren brauchte.

Ergebnisse.

1. Die Definition des Prinzips der avitaminösen Stoffwechselstörung muß sich auf die Beobachtung solcher Tiere stützen, die während ihrer Krankheit bis zu der prämortalen Periode eine auf das Anfangsgewicht vor Beginn der avitaminösen Fütterung berechnete, kalorisch suffiziente und aus Eiweiß, Fett und Kohlehydrat bestehende Nahrung mit qualitativ und quantitativ genügendem Salzgehalt vollkommen resorbieren, und bei denen klinisch und pathologisch-anatomisch für die Avitaminose charakteristische Erscheinungen nachgewiesen sind.

2. Aus diesem Satze (1) geht hervor, daß Resorptionsstörungen im Magen-Darmkanal keine notwendige Folge der avitaminösen Ernährung darstellen, sondern bei der nachgewiesenen Polymorphie des avitaminösen Krankheitsbildes nur bei einer speziellen Spielart der Avitaminose vorkommen.

3. Unter der Voraussetzung des Satzes Nr. 1 geht bei der Avitaminose

a) der Eiweißumsatz und die Eiweißoxydation in quantitativ gesteigerter, aber qualitativ normaler Weise vor sich, abgesehen vielleicht von sehr feinen qualitativen Änderungen im intrazellulären intermediären Umsatz, die aber an der Gesamtbilanz und im Blutchemismus bisher nicht festgestellt werden konnten,

b) der Fettumsatz und die Fettoxydation in quantitativ gesteigerter, aber qualitativ normaler Weise vor sich, abgesehen von einer kleinen zeitlichen Verzögerung, die vielleicht mit der herabgesetzten Zuckeroxydation zusammenhängt,

c) der Kohlehydratumsatz, entsprechend dem im Vergleich zum Eiweiß und Fett geringeren Kohlehydratgehalt des Körpers bei Eintritt in die Avitaminose, quantitativ nur in unbedeutend gesteigertem Maße, also während der weitaus längsten Zeit der Krankheit in quantitativ normalem Umfange, aber in qualitativ stark von der Norm abweichender Weise vor sich, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Zuckeroxydation mit vermindertem O_2-Verbrauch und verminderter CO_2-Bildung vonstatten geht und wahrscheinlich toxische intermediäre Produkte dabei auftreten.

4. Durch diese Veränderungen am Stoffwechsel der drei organischen Nahrungskomponenten wird der respiratorische Quotient herabgesetzt, und es wird die O_2-Aufnahme und die CO_2-Abgabe in toto verringert und somit der gesamte Gaswechsel vermindert. Bei der Avitaminose ist der Gesamtumsatz abnorm gesteigert, während der Gaswechsel abnorm verringert ist. Das ist möglich, wenn die Steigerung der Eiweiß- und Fettoxydation überkompensiert wird durch eine unvollständige Zuckeroxydation, wobei aber praktisch *alle* Zuckermoleküle im Körper bei unvollkommener Oxydation umgesetzt werden.

5. Die Störungen am Mineralstoffwechsel verlaufen im allgemeinen in Abhängigkeit von den Störungen am Eiweißstoffwechsel. Teils beruhen sie auf einer gesteigerten Abgabe bestimmter Mineralien, teils auf einem verminderten Ansatz derselben durch den Körper, teils darin, daß gewisse organische Verbindungen derselben nicht mehr aufgebaut werden können.

6. Die Gesamtsumme der avitaminösen Störungen läßt sich als einen Komplex von Störungen definieren, der durch eine Verkoppelung herabgesetzter Assimilation mit gesteigerter Dissimilation in den Körperzellen zustande kommt, wobei auch Reduktionsstörungen eine Rolle spielen.

7. Ob die Vitamine am intrazellulären Stoffwechsel einen primären Angriffspunkt oder mehrere haben, ist noch nicht sichergestellt.

8. Aus dieser im vorstehenden dargelegten Auffassung der Vitaminwirkung lassen sich wohl alle bisher bekannt gewordenen Erscheinungen bei der Avitaminose erklären. Die Polymorphie des Krankheitsbildes ergibt sich aus der bei verschiedenen Arten, wie auch bei verschiedenen Individuen derselben Art festgestellten verschiedenen Empfindlichkeit der verschiedenen Gewebe dem Vitaminmangel und dessen konsekutiven Stoffwechselstörungen, wie den dabei auftretenden intermediären Produkten gegenüber.

Literatur.

[Die mit einem *) versehenen Arbeiten waren bei der Druckbogendurchsicht meiner vorliegenden Arbeit noch nicht im Druck erschienen. Darum fehlt die Nummer des Bandes bei den betreffenden Zeitschriften.]

1) *A. Bickel*, Exper. Unters. über d. Einfluß der Vitamine auf Verdauung und den Stoffwechsel und die Theorie der Vitaminwirkung. Klin. Wochenschrift 1922, Nr. 3. — 2) *Derselbe*, Zur pathol. Physiologie der Avitaminose. Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 29. — 3) *Derselbe*, Leberexstirpation und Avitaminose in ihren Beziehungen zum Zuckerstoffwechsel. Ebendaselbst 1923, Nr. 5. — 4) *A. Bickel* und *J. A. Collazo*, Über den Mechanismus der Insulinwirkung (Beobachtungen an der Kohlehydratstoffwechselstörung bei der Avitaminose). Ebendaselbst 1923, Nr. 45. — 5) *Tsuji*, Über d. Stoffwechsel b. vitaminfr. Ernähr. Diese Zeitschr. **129**, 1922. — 6) *Yoshiue*, Über den Stickstoffstoffwechsel bei der Avitaminose. Ebendaselbst *) 1924. — 7) *Derselbe*, Über die Bedeutung der verschiedenen Vitamine für die Eisenassimilation beim heranwachsenden Individuum und über die Zusammensetzung der Körperasche bei vitaminfreier und vitaminhaltiger Ernährung. Ebendaselbst **134**, 1922. — 8) *Derselbe*, Über den Einfluß der Funktion auf den Verlauf der Avitaminosen. Ebendaselbst **134**, 1922. — 9) *Haramaki*, Vitamine und Eisenstoffwechsel beim erwachsenen Individuum. Ebendaselbst **134**, 1922. — 10) *Morinaka*, Über die anorganischen Bestandteile des Körpers bei Avitaminose. Ebendaselbst **133**, 1922. — 11) *Derselbe*, Wirkt Vitaminmangel spezifisch oxydationshemmend? Ebendaselbst **135**, 1923. — 12) *Derselbe*, Zum Phosphorstoffwechsel bei Avitaminose. Ebendaselbst **142**, 1923. — 13) *Ishido*, Über den kompensatorischen Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die avitaminösen Störungen am Knochenmark. Ebendaselbst **137**, 1923. — 14) *Derselbe*, Über Beziehungen der Avitaminose zur Wundheilung. Virchows Arch. **240**, 1922. — 15) *Collazo*, Vergleichende Untersuchungen über die Assimilationsfähigkeit der Zellen bei der Avitaminose und nach dem Hungerzustande. Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 4. — 16) *Collazo*, Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel bei der Avitaminose I. Über den Blutzucker. Diese Zeitschr. **134**, 1922. — 17) *Derselbe*, Der Kohlehydratstoffwechsel bei Avitaminose II. Glykogen und Avitaminose. Ebendaselbst **136**, 1923. — 18) *Derselbe*, Der Kohlehydrat-

stoffwechsel bei Avitaminose III. Über den Einfluß von Traubenzuckerzufuhr in kleinen und großen Mengen auf den Blutzucker beim normalen, hungernden und avitaminösen Körper. Ebendaselbst **136**, 1923. — 19) *Derselbe*, Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel bei der Avitaminose IV. Über die toxische Wirkung intermediärer Stoffwechselprodukte nach der Zuführung verschiedener Zuckerarten bei der Avitaminose. Ebendaselbst **136**, 1923. — 20) *Collazo* und *Gohse*, Über den Kohlehydratstoffwechsel bei Avitaminose V. Über den Einfluß von Produkten innersekretorischer Drüsen und einiger Arzneimittel auf die Reduktionswerte von Blut und Harn. Ebendaselbst **139**, 1923. — 21) *Collazo* und *Bosch*, Über den Fettgehalt des Blutes bei der Avitaminose. Ebendaselbst **141**, 1923. — 22) *Collazo*, Versuche über den N-Stoffwechsel bei der Avitaminose. Ebendaselbst **145**, 1924. — 23) *Rubino* und *Collazo*, Untersuchungen über den intermediären Kohlehydratstoffwechsel bei Avitaminose I. Glykogenbildung und -Umsatz bei der Avitaminose. Ebendaselbst **140**, 1923. — 24) *Alpern* und *Collazo*, Über den Einfluß des Adrenalins auf den Blutchemismus in der Norm, im Hungerzustande und bei der Avitaminose. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 1923. — 25) *Alpern*, Über den Einfluß von ultraviolettem Licht auf den Zucker- und Fettgehalt im Blute avitaminöser Tiere. Strahlentherapie **15**, 1923. — 26) *Hamburger* und *Collazo*, Fettstoffwechsel und A-Vitamin. Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 37/38. — 27) *Collazo*, Über die Alkalireserve des Blutplasmas bei Avitaminose. Diese Zeitschr. **140**, 1923. — 28) *Alpern*, Untersuchungen über den Reststickstoffgehalt des Blutes bei avitaminösen und hungernden Tauben. Ebendaselbst **138**, 1923. — 29) *Miyadera*, Über die Funktion der Verdauungsdrüsen bei Avitaminosen. Ebendaselbst **124**, 1921. — 30) *Derselbe*, Über die Beziehungen der Vitaminfunktion zum Kalkstoffwechsel. Ebendaselbst **130**, 1922. — 31) *Daizo Ogata*, Kann die avitaminöse Wachstumsstörung durch chemisch definierte Substanzen beeinflußt werden? Ebendaselbst **132**, 1922. — 32) *G. Suda*, Kann die avitaminöse Wachstumshemmung durch anorganische Substanzen kompensiert werden? Ebendaselbst **138**, 1923. — 33) *Suski*, Über die Zusammensetzung des Blutes bei experimenteller Avitaminose. Ebendaselbst **137**, 1923. — 34) *Derselbe*, Kann ultraviolettes Licht die Ausbildung der avitaminösen, hypochromen Anämie verhindern? Ebendaselbst **139**, 1923. — 35) *Derselbe*, Beschleunigt Salzzufuhr bei avitaminösen Tieren den Ausbruch nervöser Störungen? Ebendaselbst **139**, 1923. — 36) *Asada*, Über die Wirkung einseitiger Ernährung bei Avitaminose und das Verhalten der Körpertemperatur bei dieser Krankheit. Ebendaselbst **139**, 1923. — 37) *Derselbe*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Zellsalze auf Eiweißstoffwechsel, Gaswechsel und Körpergewicht. Ebendaselbst **140**, 1923 — 38) *Derselbe*, Der Fettstoffwechsel bei Avitaminose I. Der Gesamtfettgehalt und Cholesteringehalt des Körpers bei normaler und avitaminöser Ernährung. Ebendaselbst **141**, 1923. — 39) *Derselbe*, Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose II. Der Gehalt des Blutes bei normalen, hungernden, avitaminösen und phosphorvergifteten Ratten an Gesamtfett, Neutralfett, Cholesterin und Cholesterinester. Ebendaselbst **142**, 1923. — 40) *Derselbe*, Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose III. Der Fett- und Cholesteringehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Ratten. Ebendaselbst **142**, 1923. — 41) *Derselbe*, Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose IV. Über den Gaswechsel avitaminöser Ratten in nüchternem Zustande, während der Verdauung und nach Adrenalininjektionen. Ebendaselbst **143**, 1923. —

42) *Derselbe*, Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose V. Über die Verteilung der Fette und Lipoide in der Leber nach Phosphorvergiftung bei normalen. hungernden und avitaminösen Tieren. Ebendaselbst **144**, 1924. — 43) *Naito*, Über den Lecithingehalt des Gehirns und der Leber normaler und avitaminöser Tauben nach forcierter Lecithinfütterung. Ebendaselbst **142**, 1923. — 44) *Derselbe*, Über den Kephalin- und Lecithingehalt des Gehirns bei Avitaminose. Ebendaselbst **142**, 1923. — 45) *Adachi*, Über den Harnsäure- und Allantoinstoffwechsel bei Avitaminose. Ebendaselbst **143**, 1923. — 46) *Händel*, Zur Frage der Acetonämie, insbesondere bei der Avitaminose. Ebendaselbst **144**, 1924. — 47) *Barsickow*, Experimentelle Untersuchungen über die therapeutische Wirkung der Hefe bei der alimentären, multiplen Polyneuritis der Meerschweinchen und Tauben. Ebendaselbst **48**, 1913. — 48) *Yamasaki*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Vitamin- oder Zellsalzmangels auf die Entwicklung von Spermatozoen und Eiern. Virchows Arch. **245**, 1923. — 49) *Hirabayashi*, Beitrag zum Stickstoff- und Mineralstoffwechsel bei der Avitaminose. Diese Zeitschr. **145**, 1924. — 50) *Derselbe*, Über die Bedeutung der Zellsalze für den Ablauf der avitaminösen Stoffwechselstörung. Ebendaselbst *) 1924. — 51) *Derselbe*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Salze auf die Entwicklung der Spermatozoen bei weißen Mäusen. Virchows Arch. *) 1924. — 52) *Tadenuma*, Über den Einfluß der Salze auf den intermediären Stoffwechsel der organischen Substanz. Diese Zeitschr. **145**, 1924. — 53) *Händel*, Über den Einfluß der Salze auf den Stoffwechsel I. Die Beeinflussung des Gaswechsels. Ebendaselbst *) 1924. — 54) *Derselbe*, Über den Einfluß der Salze auf den Stoffwechsel II. Blutzucker und Leberglykogen. Ebendaselbst *) 1924. — 55) *Asada*, Kasuistischer Beitrag zur Vitamindosierung am Beispiel des Citronensaftes und zur oxydationssteigernden Wirkung dieses Saftes. Jahrb. f. Kinderheilk. **104**, 1924. — 56) *Watanabe*, Experimentelle Untersuchungen über die Heilung von Knochenfraktion bei der Avitaminose. Virchows Arch. *) 1924. — 57) *A. Bickel* und *J. A. Collazo*, Chemische und biologische Beobachtungen über den Tasajo. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **46**, 1923.

Der Stoffwechsel der zyklischen Verbindungen bei Bacillus pyocyaneus.

Von

J. Supniewski.

(Aus dem Institut für Serumforschung in Warschau.)

(Eingegangen am 20. Februar 1924.)

Einen speziellen Teil in der Chemie der Fäulnis- und Fermentationsprozesse stellt der Zerfall der aromatischen Verbindungen unter dem Einfluß der Mikroorganismen dar.

Schon die chemischen Eigenschaften des Benzolringes weisen auf seine Widerstandsfähigkeit gegen die Zerlegungskraft des lebenden Protoplasmas hin; jedoch existieren in dieser Hinsicht sehr große Unterschiede, und zwar in bezug auf die Tierart. Das Plasma der höher organisierten Tiere besitzt eine ganz unbedeutende Fähigkeit, die Benzolringe in Fettverbindungen überzuführen, so daß die zyklischen Verbindungen im Organismus der höheren Tiere während des Stoffwechsels sehr kleinen Veränderungen unterliegen. Diese Eigenschaft unterscheidet die Benzolverbindungen von den Fettverbindungen, welche im Organismus große Veränderungen aufweisen, sowohl infolge der Oxydation, als auch der Reduktion, die bis zum Endprodukte CO_2 führt. Die zyklischen Verbindungen spielen jedoch im Tierorganismus eine bedeutende Rolle und dienen oft als Regulatoren im Prozesse des Stoffwechsels. Fast jedes Tiereiweiß enthält Tyrosin und Tryptophan; *Landsteiner* vermutet sogar, daß die antigenen Eigenschaften des Eiweißes von der Anwesenheit dieser Aminosäuren abhängen. Die Pflanzen besitzen im Gegensatz zu den Tieren große Fähigkeit, die Fettverbindungen in zyklische Verbindungen überzuführen und ebenfalls die zyklischen Verbindungen in Fettverbindungen zu zerlegen. Die Bakterien und Pilze stehen in bezug auf die biochemischen Eigenschaften der Pflanzenwelt näher; sie besitzen nämlich die Fähigkeit, synthetisch aus den Fettverbindungen zyklische Verbindungen aufzubauen. Viele Bakterienarten produzieren das Tyrosin und Tryptophan aus Ammoniumlactat bzw. Ammoniumformiat (*Burri*, *Andrejew*). Jedoch die Eigenschaft, Benzol-, eventuell Indolringe zu zerlegen, ist nur für manche Mikroorganismen charakteristisch; im allgemeinen hat man den Eindruck, daß den grammnegativen Bakterien die Fähigkeit, zyklische Aminosäuren zu zerlegen, in größerem Maße zukommt, als den grammpositiven. Die Forschungen von *Nencki* und seiner Schule haben erwiesen, daß die Bakterien unter allen zyklischen Aminosäuren nur die Alaninkette angreifen; der Verbrauchsgrad der Kohlenstoffatome in der bestehenden Kette hängt hauptsächlich von

der Art der angewandten Bakterien ab. Die grammnegativen Mikroorganismen, z. B. Coli, Cholera, Proteus usw., vernichten die Alaninkette vollständig; als Zerfallsprodukte entstehen hierbei: Indol, Phenol, eventuell Benzol. Andere Bakterienarten zerlegen die zyklischen Aminosäuren bis auf zyklische Säuren: Derivate der Propion- eventuell Essigsäure. Manche Mikroorganismen sind sogar befähigt, die Benzolringe vollständig zu vernichten. *Wagner* fand im Staube solche Bakterien, die imstande waren, Benzol und Toluol bis auf CO_2 zu reduzieren; in ähnlicher Weise zerlegten diese Bakterien Phenol und Dioxybenzol, wobei als Übergangsprodukte Chinone entstanden. *Wagner* beobachtete, daß o-Dioxybenzol leichter dem Zerfall zugängig ist, als die betreffenden Meta- und Paraverbindungen. Diese Bakterien konnten jedoch Terpinverbindungen nicht zerlegen. *Fowler*, *Gilbert*, *Arden* und *Lochett* fanden im Wasser solche Bazillen, welche Phenol verbrauchen. Ganz anders verhalten sich hydroaromatische Verbindungen. *Kumagawa* hat in *Neubergs* Institut erwiesen, daß B. lactis aerogenes in ähnlicher Weise, wie Zuckerarten, auch Inosit zerlegt; unter den Zerfallsprodukten fand er: Acetaldehyd, Milch- und Bernsteinsäure. Dieser Prozeß ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß im Ringe der hydroaromatischen Verbindungen eine feste Doppelbindung, welche die große Widerstandsfähigkeit des Ringes gewährleistet, nicht vorhanden ist. Die hydroaromatischen Verbindungen können leicht gesprengt werden, wobei Produkte entstehen, die den Zuckern sehr ähnlich sind. Eine große Rolle beim Umsatz der aromatischen Verbindungen spielen Oxydationsfermente aus der Gruppe der Oxydasen, Phenolasen und Tyrosinasen. Manche unter den diese Fermente enthaltenden Bakterien sind fähig, die fermentative Oxydation des Tyrosins bis zur Homogentisinsäure hervorzurufen, d. h. neue Hydroxylgruppen im Benzolring zu schaffen (*Stapp*). Die Phenolasen ermöglichen die Entstehung der Melaninderivate aus dem Tyrosin. Die Melaninderivate sind, nach der Angabe von *Höhn*, Derivate des Oxyindigos; in diesem Falle entsteht also synthetisch aus dem Tyrosin ein Indolring (*Chodat*). *Stapp* fand, daß B. pyocyaneus solcher Fermente entbehrt. Die Untersuchungen von *Cordelli* haben erwiesen, daß Aspergillus imstande ist, Benzoe-, Phenylessig-, Mandelsäure und Amygdalin umzusetzen; also zyklische Verbindungen in Fettverbindungen umzuwandeln. Dieser Befund scheint darauf hinzuweisen, daß auch Pilze befähigt sind, aromatische Verbindungen zu zerlegen.

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die Zerlegungsfähigkeit verschiedener zyklischer Verbindungen von B. pyocyaneus kennenzulernen.

Technik.

Die Zusammensetzung des Nährbodens, der zu den Versuchen diente, war folgende: 0,3 Proz. K_2HPO_4, 0,5 Proz. K_2CO_3, dazu kamen gewöhnlich 0,3 bis 0,5 Proz. der Untersuchungsverbindungen und manchmal als Kohlenstoffquelle 0,5 Proz. CH_3CO_2Na, und als Stickstoffquelle 0,5 Proz. $(NH_4)_3PO_4$. Der Nährboden, bei welchem p_H stets bestimmt wurde, wurde in der Menge von 1 Liter in Flaschen gegossen und sterilisiert. Zu den Untersuchungen wurde ein Pyocyaneusstamm aus dem Pasteur-Institut benutzt, die Bouillonkulturen im Thermostaten aufbewahrt und davon täglich mit einer sterilen Pipette 10 ccm entnommen.

Im Nährboden wurden berechnet:

1. p_H-Gehalt mittels kolorimetrischer Methoden.

2. Puffer des Nährbodens bis p_H 3,9; man titrierte 10 ccm des Nährbodens kolorimetrisch (Bromthymolblau) n 10 H_2SO_4. Zahlen der Reihe 3,9 weisen die Quantität der zur Titrierung benutzten Kubikzentimeter n/10 H_2SO_4 auf.

3. Puffer des Nährbodens bis p_H 9,0; Titrierung wie angegeben (Phenolphthalein) n 10 NaOH 10 ccm des Nährbodens. Die Zahlen der Reihe A — 9,0 bezeichnen die Quantität der zur Titrierung benutzten Kubikzentimeter n/10 NaOH.

4. Der Aminostickstoff wurde nach der Methode von *Sörensen* bestimmt. Die Reihe NH_2 bezeichnet die Zahl n/10 NH_2, die in 10 ccm des Nährbodens enthalten ist.

5. Ammoniak nach *Zaleski*. Die Reihe NH_3 weist darauf hin, wieviel n/10 NH_3 10 ccm des Nährbodens enthalten.

6. Die Fähigkeit, Brom zu binden, wurde von der Anwesenheit der Aminobenzol- und Phenolgruppen abhängig gemacht. Aminobenzole und Phenole können 3 Atome Brom zu ihrem Ringe binden. Diese Methode kann also als quantitativer Maßstab des Benzolringes, der unter dieser Form vorkommt, dienen. Hier wurde die von *Saposchnikow* und *Schachnowski* modifizierte *Reinhardt*sche Methode angewandt. Man bemüht sich nur, die Bindung des Broms bei saurer Reaktion durchzuführen (*Beckurts*, Die Methoden der Maßanalyse, S. 473. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, 1913). Die Fähigkeit, Brom zu binden, weist nur auf die Anwesenheit der zyklischen Gruppen NH_2 und OH hin, ohne sie jedoch zu differenzieren. Wenn in unserem Nährboden z. B. die Aminogruppe in die Gruppe OH übergeht, so kann dieser Vorgang mittels der bromometrischen Titrierung nicht nachgewiesen werden. Eine gewisse Differenzierung kann uns die kolorimetrische Methode der NH_2-Bestimmung liefern; die Analyse des Nährbodens mittels $NaNO_2$ und HCl bei der Temperatur 0° und Bindung des β-Naphthols in Gegenwart von KOH. Die rote Färbung wird mit einer speziell hergestellten kolorimetrischen Skala verglichen. Die Anwesenheit der entstehenden OH-Gruppen kann mittels der $FeCl_3$ Reaktion nachgewiesen werden, diese Probe ist jedoch viel zu wenig empfindlich, um kleine Quantitäten zu entdecken. Die Bakterien selbst binden nur ganz unbedeutende Mengen des Broms; so z. B. 10 ccm einer 14 tägigen dichten Kulturemulsion haben nur 0,3 ccm n/10 Brom gebunden. In der Reihe Br findet man Zahlen, welche die Quantität des n/10 Br bezeichnen, die 10 ccm des Nährbodens binden.

Während des Bakterienwachstums wurden qualitative Untersuchungen des Nährbodens ausgeführt, um eventuell Übergangsprodukte des Stoffwechsels zu entdecken.

Benzol, Phenol und *Toluol* wirken tötend auf B. pyocyaneus und hemmen sein Wachstum auf gewöhnlichem Nährboden schon in der Menge von 0,1 bis 0,3 Proz. Lösung.

Weniger empfindlich ist dieser Mikroorganismus gegen zyklische Säuren; jedoch hat schon *Liot* bemerkt, daß die Mehrzahl dieser Säuren nicht im Nährmedium als Kohlenstoffquelle für die betreffende Bakterie dienen kann.

Benzoesäure: Zum Versuch wurde ein Nährboden benutzt, der Mineralstoffe, 0,5 Proz. benzoesaures Ammonium enthielt. Dieser Nährboden wies nur eine ganz schwache Trübung auf und der p_H-Gehalt blieb fast unverändert. Zu diesem Nährboden wurden 0,5 Proz. Natriumacetat hinzugefügt. Die chemischen Veränderungen des Nährbodens unter dem Einfluß des Wachstums von B. poycyaneus zeigt uns das Protokoll 1.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2
1	8,0	6,4	2,2	6,8
5	8,2	6,4	1,2	6,5
10	8,6	6,6	0,4	6,3

Der Mikroorganismus entwickelte sich in dieser Flüssigkeit sehr üppig; die Färbung war intensiv. Die Veränderungen des Nährbodens waren vom Vernichten des Acetats und Assimilierung des Ammons abhängig. Wir sehen aus diesem Versuche, daß die Benzoesäure das Wachstum unserer Bakterien nicht hemmt.

Phenylessigsäure. Als Nährboden wurde eine Mineralstoff enthaltende Flüssigkeit, 0,3 Proz. Ammoniumphosphat, 0,3 Proz. Natriumphenylacetat benutzt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2
1	7,6	7,6	2,8	6,2
14	8,2	6,9	1,2	5,9

Auf diesem Nährboden war das Wachstum und die Farbstoffproduktion sehr schwach. Nur unbedeutende Mengen der Phenylessigsäure wurden in Benzoesäure umgewandelt, die erste diente als Kohlenstoffquelle für B. pyocyaneus. (Das Destillat erweist die Reaktion mit $FeCl_3$ und H_2O_2.)

Mandelsäure. Zu derselben Flüssigkeit wurde anstatt Natriumphenylacetat razemisches Mandelsäurenatrium in der Menge von 0,3 Proz. hinzugefügt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2
1	8,0	6,8	1,6	8,0
14	8,6	6,5	0,7	7,4

Auf diesem Nährboden war das Wachstum sehr schwach und ohne Farbstoff; es bildeten sich schleimartige Substanzen. Man muß annehmen, daß die Mandelsäure teilweise in Benzoesäure übergegangen war (Reaktion mit $FeCl_3$ und H_2O_2 positiv). Am 14. Tage des Wachstums zeigte der Nährboden die Fähigkeit, die Polarisationsebene nach rechts zu drehen, was bedeuten würde, daß die Bakterien die linksdrehende Mandelsäure zerlegten.

o-Phthalsäure. Man benutzte denselben Nährboden (p_H 7,6) + 0,3 Proz. Natriumorthophthalat. Während des 14tägigen Aufenthaltes im Thermostaten konnte man weder Trübung noch Veränderungen des Nährbodengehaltes nachweisen.

Salicylsäure. Zum Nährboden, der Mineralstoffe, 0,6 Proz. Ammoniumphosphat, 0,3 Proz. Natriumbicarbonat und 0,5 Proz. Salicylsäure enthielt, wurde etwas B. pyocyaneus-Emulsion zugesetzt.

Tage	p_H	NH_2	A—9,0	Br
1	7,3	5,2	1,7	13,1
3	7,8	5,2	1,4	13,1
6	8,2	5,2	0,9	12,8
9	8,2	5,2	0,9	12,8

Das Bakterienwachstum war auf diesem Nährboden mangelhaft, mit Farbstoffspuren. Es ist nicht gelungen, irgendwelche Veränderungen im Salicylgehalt nachzuweisen. Man kann daraus urteilen, daß diese Säure nicht von den Bakterien verbraucht wird, was schon von *Liot* angegeben wurde.

Salicylin. Als Glucosid enthält diese Verbindung aromatisches Saligenin und Glucose. Salicylin kann als Kohlenstoffquelle nur für solche Bakterien dienen, welche fähig sind, diese Verbindung in ihre zwei Komponenten zu zerlegen. Man setzt zum Nährboden 0,3 Proz. Ammoniumphosphat und 0,5 Proz. Salicylin zu. Während des Bakterienwachstums bezeichnete man die Reduktionsfähigkeit des Nährbodens mit der *Bertrand*schen Methode (n/10 $KMnO_4$ verbraucht für 10 ccm des Nährbodens) und der qualitativen Phenolreaktion mit $FeCl_3$.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	Br	*Bertrand*	OH-Phenol
1	7,0	1,1	0,7	3,0	3,7	0,0	—
3	7,1	1,1	1,2	3,0	5,3	0,0	—
6	7,1	1,2	1,2	3,0	5,3	0,0	—
9	6,9	1,1	1,2	3,0	5,3	0,0	—
12	6,6	1,0	1,3	2,8	6,8	0,0	Spur
15	6,6	1,0	1,5	2,8	7,5	0,0	Stark
18	6,6	0,8	2,7	2,5	12,2	0,1	„
21	6,6	0,8	2,7	2,4	14,5	0,0	„
24	6,6	0,8	1,9	2,3	14,7	0,0	„

Das Wachstum ging langsam, aber üppig vor sich unter Bildung von Farbstoff. Der Nährboden wurde infolge des Zuckerverbrauches sauer, gleichzeitig traten auch Pufferveränderungen auf. Bevor die Kulturflüssigkeit die p_H 6,6 erreicht hat, wurden keine bedeutenden Differenzen in der Assimilation des Stickstoffs und der Ausscheidung freier Salicylverbindungen bemerkt. In diesem Moment fängt die intensive Produktion der Salicylverbindungen an, was auf den Zerfall des Salicylins und die gleichzeitig verlaufende Assimilation des Stickstoffes hindeutet. Es scheint, als ob der B. pyocyaneus nur bei p_H 6,6 fähig ist, Salicylin stark zu zerlegen. Die ausgeschiedene Glucose wird sofort verbraucht, so daß es nicht gelingt, reduzierende Substanzen während des Wachstums im Nährboden nachzuweisen. Um zu bestimmen, was aus dem aromatischen Bestandteil des Salicylins entsteht, wurde der Nährboden am 24. Tage der Destillation im Wasserdampf unterworfen. Im Destillate fand man nur eine Spur solcher Substanzen, die mit $FeCl_3$ reagieren; die Verbindungen, welche nach der Destillation zurückgeblieben sind, gaben diese Reaktion in sehr starkem Grade.

Der Rest der Kulturflüssigkeit wurde mit Äther ausgeschüttelt. Dieser Ätherauszug gab eine kaum angedeutete Reaktion mit $FeCl_3$; die Reaktion mit KOH und Aceton (um salicylsauren Aldehyd nachzuweisen) blieb negativ. Nach dem Ausschütteln reagierte die Flüssigkeit intensiv mit $FeCl_3$. Diese Flüssigkeit wurde mit H_2SO_4 angesäuert und abermals mit Äther extrahiert. Es war zu bemerken, daß alle mit $FeCl_3$ reagierenden Substanzen aus der angesäuerten Flüssigkeit in den Äther übergegangen sind. Der Ätherauszug gab alle für die Salicylsäure charakteristischen mikro- und makrochemischen Reaktionen. Dieser Befund scheint darauf hinzuweisen, daß das Salicylin einem langsam fortschreitenden Zerfall, bis auf Glucose und Saligenin, unterliegt. B. pyocyaneus bewirkt die

Oxydation dieser Verbindungen, wobei Salicylaldehyd und schließlich Salicylsäure entsteht, welche, wie aus dem vorherigen Versuch hervorgeht, nicht mehr abgebaut werden kann.

$$O\text{-}OHC_6H_4CH_2OH, \quad O\text{-}OHC_6H_4COH, \quad O\text{-}OHC_6H_4CO_2H.$$

Aus der Gruppe der aromatischen Amine wurden folgende Verbindungen untersucht.

Anilin. Zum Stammnährboden wurden 0,5 Proz. Anilinhydrochlorid zugesetzt. Den Verlauf der chemischen Veränderungen weist das Protokoll nach.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3	Br
1	7,1	2,6	0,3	0	0	10,9
14	7,1	2,6	0,3	0	0	10,9
Nachdem wurden 0,5 Proz. Natriumacetat zugesetzt.						
1	7,1	6,1	0,4	0	0	10,9
14	7,8	6,4	0,2	0	0	10,9

Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Anilin weder als Kohlen- noch als Stickstoffquelle für B. pyocyaneus dienen kann.

o-Diaminobenzol. Zu der Nährflüssigkeit wurden 0,5 Proz. o-Diaminobenzolhydrochlorid zugesetzt. Folgende Veränderungen wurden bemerkt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0
1	7,2	4,3	0,6
14	8,0	3,8	0,1
Als Kohlenstoffquelle wurden 0,5 Proz. Natriumacetat angewandt.			
1	6,8	0	0
14	8,2	0	0

Das Bakterienwachstum war auf diesem Nährboden spärlich; es ist also anzunehmen, daß o-Diaminobenzol als Kohlen- und Stickstoffquelle für B. pyocyaneus nicht angewandt werden kann.

Sulfanilsäure. Nährboden wie gewöhnlich + 0,3 Proz. Natriumsulfanilat.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	Br
1	7,2	5,0	0,8	0	12,1
3	8,2	5,3	0,4	0	12,1
5	8,4	5,2	0,2	0	12,1
7	8,6	5,4	0,1	0	12,1
Als Kohlenstoffquelle benutzte man 0,5 Proz. Natriumacetat:					
1	7,0	5,9	1,1	0	12,1
4	7,8	6,2	0,5	0	11,9
7	8,4	6,4	0,1	0	11,6
10	8,4	6,4	0,1	0	11,5

In der Nährflüssigkeit, die nur Sulfanilsäure enthielt, war das Bakterienwachstum kaum merklich; es war unmöglich, irgendwelche Veränderungen im Säuregehalt zu konstatieren. Es ist also anzunehmen, daß die Kohlenstoffatome dieser Säure nicht assimiliert werden können. Nachdem Natriumacetat hinzugefügt wurde, war das Wachstum üppiger, und es traten gleichzeitig chemische Umsetzungen der Sulfanilsäure hervor. Während des

Bakterienwachstums blieb die Phenolreaktion der Kulturflüssigkeit negativ, die Ammoniakreaktion ganz spärlich. Es ist anzunehmen, daß die Sulfanilsäure keine besonders günstige Stickstoff- und Schwefelstoffquelle für B. pyocyaneus darstellt. (Der Nährboden enthielt keine Schwefelverbindungen.)

l-Tyrosin. *Nencki* und seine Schüler haben erwiesen, daß Fäulnismikroben und die Mehrzahl der Anaeroben befähigt sind, die Alaninkette des Tyrosins abzubauen. Die weiteren Versuche von *Sasaki* und *Kurona* haben gezeigt, daß die Aminogruppe der Alaninkette in erster Reihe abgespalten wird, wobei Ammoniak und p-Oxyphenylmilchsäure entstehen, die erste wird bis auf p-Oxyphenylbrenztraubensäure oxydiert. Von der Carboxylgruppe der Oxyphenylbrenztraubensäure wird CO_2 abgespalten, wobei p-Oxyphenylacetaldehyd entsteht, welcher bis zur p-Oxyphenylessigsäure oxydiert wird. Von der Carboxylgruppe der p-Oxyphenylessigsäure wird CO_2 abgespalten, wobei p-Kresol entsteht; die weiterschreitende Oxydation führt über den p-Oxybenzaldehyd (wie das *Sasaki* beim Proteus fand) zur p-Oxybenzoesäure und schließlich bis zum Phenol. Während der Zerfallsprozesse können manche Übergangsprodukte sekundärer Reduktion unterliegen, so z. B. aus der p-Oxyphenylmilchsäure kann p-Oxyphenylpropionsäure und p-Oxyphenyläthylalkohol entstehen, so wie das bei Hefen vorkommt. Manche Mikroben, wie z. B. Coli und Vibrionen, zerlegen Tyrosin in anderer Weise. Zuerst wird die Carboxylgruppe vernichtet, wobei p-Oxyphenyläthylamin entsteht, dann als Übergangsprodukt der betreffende Alkohol, welcher schließlich bis zur p-Oxyphenylessigsäure oxydiert wird. Einen gewissen Widerspruch stellen hier die Ergebnisse von *Rhein* dar. Dieser Forscher fand, daß Coli zwar Phenol aus der p-Oxybenzoesäure, aber nicht aus p-Oxyphenylmilch-, p-Oxyphenylbrenztrauben-, p-Oxyphenylpropion-, p-Oxyphenylessigsäure, p-Oxyphenyläthylamin und p-Oxyphenyläthylalkohol und p-Kresol bilden kann. Manche Mikrobenarten produzieren Oxydationsfermente der Phenolasen und Tyrosinasengruppe, welche das Entstehen neuer Hydroxylgruppen im Ringe der Benzolsäure (Homogentinsäuren, *Stapp*) und der Melanine ermöglichen. Nach der Ansicht von *Höne* sind das Derivate des Dioxyindigos, in solcher Weise kann aus Tyrosin ein Indolkern entstehen. Diese Fermente wurden jedoch bei B. pyocyaneus nicht gefunden. Es muß noch angedeutet werden, daß die Mikroorganismen mit großer Schwierigkeit die p-Oxyphenylessigsäure in Phenole überführen, und wenn sie in Nährboden eine andere Kohlenstoffquelle (Zucker) finden, vernachlässigen sie diesen Umsatz vollständig; dieser Befund macht uns verständlich, warum phenylproduzierende Bakterien in Gegenwart von Zucker kein Phenol bilden (*Berthelot*). Die grammnegativen Mikroben sind im allgemeinen viel widerstandsfähiger gegen die schädigende Wirkung der zyklischen Verbindungen als die grammpositiven (*Kaufmann*); andererseits zerlegen auch die ersten das Tyrosin näher dem Phenol, als die anderen (*Sicke*, *Neisser*, *Salus*, *Long*, *Dobrowolski*, *Metschnikow*).

In unseren Versuchen wurde der Mineralstoffe enthaltende Nährboden mit 0,2 Proz. Tyrosin gebraucht. Die Untersuchungen waren infolge der schwachen Löslichkeit des Tyrosins sehr erschwert.

Tage	p_H	A–3,9	A–9,0	NH_2	NH_3	Br
1	7,2	13,6	2,4	0,2	0,0	2,6
4	8,2	14,4	2,0	0,2	0,0	2,4
8	8,4	16,5	1,6	0,1	0,0	1,8
12	8,9	18,0	0,0	0,1	0,1	0,2

Das Bakterienwachstum war ziemlich üppig mit starker Farbstoffbildung; nach der Alkalisierung der Kulturflüssigkeit entstanden schleimige Substanzen. Die Brombindungsfähigkeit sank bis auf 0 herab, was auf die große Schädigung des Phenolkerns hinzuweisen scheint; die Abwesenheit des Phenols während des Wachstums wäre auch in diesem Sinne zu deuten. Dieses Problem verlangt noch weitere Nachprüfung. Ein Teil des Tyrosinstickstoffs wird von den Bakterien assimiliert, der Rest in Ammoniak umgewandelt.

l-Tryptophan. Es geht aus den Forschungen von *Nencki* und seiner Schule hervor, daß der Abbau der Tryptophanalaningruppe in ähnlicher Weise vor sich geht, wie der des Tyrosins, Phenylalanins und, wie letztens *Sasaki* nachgewiesen hat, auch der synthetischen Aminosäure des α-Naphthylalanins. Zuerst wird die Aminogruppe abgespalten, wobei die Indolmilchsäure entsteht; infolge der Oxydation entsteht die Indolbrenztraubensäure (manche Bakterienarten reduzieren einen Teil dieser Säure bis auf die Indolpropionsäure). Nachdem diese Säure CO_2 ausgeschieden hat, entsteht Indolacetaldehyd (Hefe reduziert es bis auf Indoläthylalkohol), welches die Oxydation in Indolessigsäure überführt. Infolge der Abspaltung des CO_2 wird Indolessigsäure in Skatol umgesetzt, welcher zum Aldehyd und zur Indolcarbonsäure oxydiert wird; schließlich verschwindet auch aus dieser Säure CO_2, um Indol zur Erscheinung zu bringen. Die Ergebnisse von *Sasaki* und *Kurona* haben diese Angaben vollständig bestätigt; man muß jedoch annehmen, daß manche Bakterienarten diesen Zerfall in ähnlicher Weise bewirken, wie die des Tyrosins, d. h. Indoläthylamin als Übergangsprodukt erscheint. Die Untersuchungen von *Braun* und *Cahn-Bronner* haben gezeigt, daß die Mikroben der Koligruppe nicht vermögen, die Indolcarbonsäure zu assimilieren. Gleichzeitig mit dem sukzessiven Verschwinden der Kohlenstoffatome aus der Alaninkette wird auch die Fähigkeit des Tryptophans, mit Bromwasser zu reagieren, vernichtet; allmählich erscheinen aber die charakteristischen Indolreaktionen. Die Reaktion von *Salkowski* ist nach *Fiebers* Meinung schon der Indolbrenztraubensäure und Indolessigsäure zugängig; sie ist also dem freien α-Kohlenstoffatome der Alaninkette eigen. Nach Vernichtung dieses Kohlenstoffatoms erscheinen die β-Naphthol- und Chinonreaktionen ebenso wie die Natriumnitroprussid- und p-Dimethylaminobenzaldehydreaktion; die letzte ist für Indol ganz charakteristisch. Ebenso, wie beim Tyrosin, stört die Anwesenheit des Zuckers auch hier die Indolbildung; es ist wohl bekannt, daß in Gegenwart besserer Kohlenstoffquelle der Umsatz der Indolessigsäure unmöglich wird. Ebenso, wie Phenol, ist auch die Indolbildung hauptsächlich den grammnegativen Bakterien eigen [Coligruppe, Cholera, Influenza (*Rhein*), Proteus und B. fusiformis (*Krumwiede, Pratt*)]. Manche Mikrobenarten, z. B. Paratyphus und Paracoli sind wohl fähig, Phenol, nicht aber Indol zu produzieren. Die Indolreaktion einer Kulturflüssigkeit weist darauf hin, daß die betreffende Bakterienart Tryptophan zu zerlegen vermag, und daß der Zerfall bis auf Indol hinabgeht. Auf Grund der Angabe, daß Indol als Nährboden dienen kann, behaupten *Herzfeld* und *Klinger*, daß manche Mikroorganismen, z. B. Typhusbakterien, deshalb keine Indolreaktion bewirken, weil das entstehende Indol sofort zum Aufbau des Bakterienleibes verbraucht wird. Die Ergebnisse von *Fieber* stehen mit den Anschauungen von *Herzfeld* und *Klinger* im Widerspruch. *Breslauer* fand, dank seiner verfeinerten Methode, in den Pyocyaneuskulturen Spuren von Indol; es gelang aber bisher nicht, Indolsäuren nachzuweisen. Man mußte also annehmen,

daß diese Mikroben die Zerfallsprozesse des Indols noch weiterführen. Die Forschungen von *Sasaki* scheinen etwas Licht auf diese Probleme zu werfen; dieser Autor fand nämlich, daß Tryptophan unter dem Einfluß von B. subtilis in die Anthranilsäure übergeführt wird, es findet hier also der Abbau des Pyrrolringes vom Indol statt.

$$\text{Indol} \rightarrow C_6H_4(CH{=}CH.OH)(NH_2) \rightarrow C_6H_4(COOH)(NH_2)$$

$$\rightarrow C_6H_{?}(COOH)(NH_2) \rightarrow \begin{matrix} CH_3CO_2H \\ NH_3 \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} HCOOH \\ NH_3 \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CO_2 \\ NH_3 \end{matrix}$$

Zum gewöhnlichen Mineralnährboden wurden 0,2 Proz. l-Tryptophan zugesetzt. Der chemische Umsatz war folgender:

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3
1	7,6	6,4	1,4	0,8	—
3	8,0	6,0	1,2	0,6	—
6	8,2	6,2	1,0	0,8	0,8
9	8,4	5,8	0,8	0,6	0,6
10	8,6	5,8	0,2	0,4	0,4

Das Wachstum war üppig, mit intensiver Farbstoff- und Schleimbildung. Am sechsten Tage des Bakterienwachstums stellt sich die Tryptophanreaktion mit Bromwasser ein, was auf einen starken Zerfall dieser Aminosäure hinweist. Die Indolreaktion war negativ. Die zehntägige Kultur wurde der Destillation unterworfen; es wurden im Destillate weder Indol- noch Benzolverbindungen gefunden; das Ätherausschütteln vermochte zyklische Carbonsäuren nicht nachzuweisen. In der Kulturflüssigkeit wurde ausnahmslos Ammoniumcarbonat gefunden; das scheint das Endprodukt der Tryptophanreduktion zu sein.

Man prüfte das Wachstum des B. pyocyaneus auf den Mineralnährböden mit 0,1 Proz. *Indol.* Man bestimmte den Gehalt des Indols mit der jodometrischen Methode. Wir nutzten die Fähigkeit des Indols, 1 Atom in β-Stellung zu binden, aus. Die Nummern der Reihe J weisen auf die Zahl der Kubikzentimeter n/10 J, die von 10 ccm des Nährbodens gebunden wurden.

Tage	p_H	A—9,0	NH_3	NH_2	J
1	7,0	2,8	0,0	0,0	3,5
7	7,4	2,7	Spur	0,0	3,4
14	8,2	1,8	Stark	0,5	2,8

Die Bazillen entwickelten sich auf diesem Nährboden sehr langsam und gaben nur eine Spur des Pigments. Der Nährboden hatte nach 14 Tagen p_H 8,2 und gab eine Ammoniumreaktion. Die Bazillen spalteten Indol sehr langsam, und nach 14 Tagen enthielt der Nährboden noch viel Indol. Es ist möglich, daß der große Gehalt des Indols im Nährboden die Spaltung des letzten hemmte. Das Indol entsteht vom Tryptophan in ganz un-

bedeutenden Quantitäten und wird gleich weiter zersetzt, so daß es sich im Nährboden in größeren Quantitäten nicht sammeln kann; daher hemmt es das Wachstum unserer Bazillen nicht.

Um Anthranilsäure, als eventuelles Übergangsprodukt, zu untersuchen, wurde zum Nährboden 0,5 Proz. Natriumanthranilat zugesetzt und während 14 Tagen die chemischen Veränderungen untersucht.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3	Br
1	7,4	5,1	0,3	0,0	0,0	16,0
3	7,4	5,2	0,3	0,0	0,0	16,0
5	7,5	5,3	0,6	0,4	0,4	15,1
7	7,6	6,1	0,9	0,8	0,7	11,3
9	8,0	6,3	1,1	0,9	0,8	5,1
11	8,2	6,9	1,3	1,2	1,2	0,3
14	8,4	6,9	1,4	1,4	1,4	0,1
17	8,4	6,9	1,4	1,4	1,4	0,1

Auf diesem Nährboden ging das Wachstum unserer Bazillen langsam, aber üppig vor sich, unter Pigmentbildung. Schon am fünften Tage fing der Zerfall der Anthranilsäure an, wobei sich Ammoniak bildete. Am 14. Tage gab die Kulturflüssigkeit weder Diazoreaktion noch Bodensatz mit Bromwasser. Die Phenolreaktion war während des Wachstums negativ. Das von einer 14tägigen Kultur erhaltene Destillat erwies weder Phenol noch Alkohol und Aldehydreaktion; es trat aber in großer Menge Ammoniak hervor. Es gelang auch weder im Destillate noch im Ätherauszug flüchtige Säuren nachzuweisen. Die Nährflüssigkeit bewirkte keine $AgNO_3 + NH_3$ und Fehlingreduktion; sie löste $Cu(OH)_2$ nicht.

B. pyocyaneus wurde auf einem 2 Proz. $CaSO_3$ enthaltenden Nährboden kultiviert. Als die Kultur nicht mehr mit Bromwasser reagierte, wurde sie auf den Gehalt an Aldehyden geprüft. Sie gab eine Spur der Aldehydreaktion mittels Nitroprussid und Denigès-Reagens.

Zum nächsten Versuch wurde ein Nährboden mit 5 Proz. $CaCO_3$ benutzt. Die Kulturflüssigkeit wurde nach Verdampfung mit siedendem 90proz. Alkohol extrahiert. Der Alkoholauszug gab die für Ca charakteristische Reaktion und reduzierte $AgNO_3$; auch die Kakodylreaktion und die mit $FeCl_3$ (auf die Anwesenheit von Essigsäure) waren positiv. Dieser Befund scheint darauf hinzuweisen, daß der Alkoholauszug Ameisen- und Essigsäuresalze enthält. Der Bodensatz, welcher nach dem Alkoholauszug blieb und im Wasser gelöst wurde, enthielt Ca nicht mehr, er gab auch keine, für organische Säuren charakteristische Reaktionen. In dem nach Wasserextraktion gebliebenen Bodensatz wurde Oxalsäure nicht gefunden. Die Jodoform- und $Cu(OH)_2$-Reaktionen waren negativ.

Dann wurden Versuche mit Paraamidobenzoesäure enthaltendem Nährboden durchgeführt; als Quelle dieser Säure wurde 0,5 Proz. Natriumparaamidobenzoat angewandt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	6,6	6,4	1,7	16,4
14	6,6	6,4	1,7	16,4

Sowohl das Bakterienwachstum wie die Phenol- und Ammoniakreaktion blieben negativ.

Wir fügten 0,5 Proz. Natriumacetat hinzu:

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	7,2	11,7	0,9	16,4
14	8,0	12,7	0,3	16,0

Auf diesem Nährboden bemerkten wir ein schwaches Wachstum auf Kosten des Natriumacetats. Man benutzte als Kontrolle einen ähnlichen Nährboden, aber anstatt Natriumacetat wurden 0,3 Proz. Ammoniumphosphat hinzugefügt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	Br
1	6,8	6,0	2,0	3,4	14,5
14	8,4	5,0	0,5	3,3	14,2

Das Wachstum war spärlich, unter mangelhafter Farbstoff- und Schleimbildung. Die Phenolreaktion war negativ; man muß also annehmen, daß als einzige Kohlenstoffquelle nur CO_2 der Carbonate diente. (Wir bemerkten keine Veränderungen in der Reihe Br.)

In ähnlicher Weise wurde die Metaamidobenzoesäure untersucht, wobei man zum Nährboden 0,5 Proz. dieser Säure zufügte.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br	NH_2
1	8,0	8,6	0,3	16,5	—
14	8,0	8,6	0,3	16,5	—

Es trat kein bedeutendes Wachstum ein, irgendwelche chemische Veränderungen blieben aus. Nach dem Zusatz von 0,5 Proz. Natriumacetat als Kohlenstoffquelle:

1	7,0	10,3	0,9	16,5	—
14	8,4	11,3	0,1	16,5	—

wurde die Mikrobenvermehrung etwas deutlicher. Anstatt Natriumacetat wurden 0,3 Proz. Ammoniumphosphat als Stickstoffquelle zugefügt.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br	NH_2
1	7,2	6,5	2,7	15,6	7,2
14	8,4	0,5	1,4	15,6	7,1

Das Wachstum und die Phenolreaktion verliefen negativ. Aus den obigen Versuchen geht hervor, daß nur die o-Amidobenzoesäure gleichzeitig als Kohlen- und Stickstoffquelle für B. pyocyaneus dienen kann; den betreffenden Meta- und Paraverbindungen kommt diese Eigenschaft nicht zu. Dieser Befund erinnert an die Ergebnisse von *Wagner*, dieser Autor fand, daß die Orthoverbindungen am leichtesten dem Abbau unterliegen. Wahrscheinlich handelt es sich um die Nachbarschaft der Gruppen bei den nächstliegenden Kohlenstoffatomen des Benzolringes. Diese Gruppen wirken auf die dieses Ringes, und der Benzolring kann leicht zerfallen, indem er die Fettverbindungen bildet. Wir konnten nicht feststellen, welche Verbindung gleich nach dem Zerfall des Benzolringes entsteht. Die Abwesenheit der Phenolreaktion zeigt, daß die Desamidierung der Aminosäuren nicht vor dem Zerfall des Benzolringes auftritt. Der weitere Zer-

fallsprozeß geht wahrscheinlich durch einfachere Fettsäuren, und endlich bekommen wir das Ammoniumcarbonat als Endprodukt des Tryptophanzerfalls.

Beim Zerfall des Pyrrolringes des Indols entsteht eine Verbindung, welche eine Kohlenstoffdoppelbindung in seiner Fettkette enthält. Diese Verbindung muß wegen ihres chemischen Baues den o-Amidozimtverbindungen nahestehen. Um zu prüfen, ob B. pyocyaneus die o-Aminozimtverbindungen spalten kann, benutzten wir den Mineralnährboden mit 0,5 Proz. o-amidozimtsaurem Natrium. Die Veränderungen des Nährbodens stellt uns das Protokoll dar.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	7,0	9,4	1,2	11,6
14	8,4	10,8	1,0	11,4

Auf diesem Nährboden entwickelten sich die Bazillen sehr schwach. Die Phenolreaktion war negativ und wir bemerkten keine Veränderungen im Br, das weist darauf hin, daß die Zimtsäure nicht verbraucht wurde. Nachdem fügten wir zum Nährboden 0,5 Proz. Natriumacetat (siehe Protokoll.)

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	6,8	8,5	0,6	11,4
14	8,4	8,9	0,1	11,6

Auf diesem Nährboden war das Wachstum etwas üppiger, aber wir fanden keine Veränderungen im Br (Phenol und NH_3-Reaktionen negativ), was darauf hinweist, daß nur das Acetat verbraucht wurde.

Wir benutzten denselben Nährboden mit 0,5 Proz. Ammoniumphosphat (anstatt des Natriumacetats).

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_3	Br
1	7,2	6,0	1,8	4,5	11,0
14	8,4	5,7	0,9	4,3	11,0

Das Wachstum der Bazillen war auf diesem Nährboden sehr schwach. Das Protokoll weist darauf hin, daß die o-Aminozimtsäure weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle für B. pyocyaneus dienen kann. Theoretisch betrachtet, müssen sich die o-Aminozimtverbindungen in den Indolzerfallsprodukten befinden und weiter zersetzt werden. Den Widerspruch zwischen den theoretischen Grundlagen und unseren Befunden können uns die Untersuchungen von *Liot* erklären. *Liot* fand, daß B. pyocyaneus von der Gruppe der Fumarsäure nur die cis-Säuren assimilieren kann, d. h., daß hier die stereochemischen Beziehungen eine große Rolle spielen. Die o-Aminozimtsäure, welche beim Indolzerfall entsteht, muß eine cis-Säure sein. Unsere Untersuchungen zeigen, daß wir mit der trans-o-Aminozimtsäure zu tun hatten.

Wir führten weitere Untersuchungen mit dem Mineralnährboden + 0,5 Proz. m-aminozimtsauren Natriums aus.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	7,0	10,0	1,2	9,0
14	8,4	11,4	0,3	8,9

Wir bemerkten auf diesem Nährboden eine Spur des Wachstums. Dann fügten wir zum Nährboden 0,5 Proz. Natriumacetat zu.

Tag	p_H	A—3,9	A—9,0	Br
1	7,0	8,0	1,4	8,9
24	7,6	7,4	0,6	8,0

Das Wachstum der Bazillen war wegen des Mangels an Stickstoff gehemmt.

Wir fügten anstatt des Natriumacetats 0,5 Proz. Ammoniumphosphat zu.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	Br
1	7,2	6,2	1,6	5,0	11,1
24	8,0	6,4	0,9	5,0	11,0

Das Wachstum war mangelhaft.

Es geht aus dem Protokoll hervor, daß die m-Aminozimtsäure weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle von B. pyocyaneus ausgenutzt sein kann.

B. pyocyaneus gibt keine Indolreaktion, weil das aus dem Tryptophan ausgeschiedene Indol weiter zerlegt wird. Der Zerfall des Pyrrolringes ruft die Entstehung der o-cis-Amidozimtverbindungen hervor. Diese Zimtverbindung wird weiter bis zur Anthranilsäure oxydiert. (*Sasaki* hat es zum erstenmal bei der Zerlegung des Tryptophans durch B. subtilis festgestellt.) Die Anthranilsäure wird weiter bis zum Ammoniumcarbonat zersetzt. Dies erklärt, warum wir in den alten Pyocyaneuskulturen auf dem Tryptophannährboden Ammoniumcarbonat finden.

B. pyocyaneus zersetzt die zyklischen Aminosäuren, indem er die Carboxylgruppen vernichtet; außerdem spaltet er von den Aminogruppen das Ammoniak ab. Die beiden Prozesse alkalisieren den Nährboden bis zum p_H 8,8 und hemmen infolgedessen das weitere Bakterienwachstum.

Zusammenfassung.

1. B. pyocyaneus ist nicht fähig, die Mehrzahl der Benzolderivate abzubauen; er vermag nur die aliphatische Kette zu zerstören.

2. Die Aminobenzolverbindungen stellen sehr schlechte Stickstoffquellen für B. pyocyaneus dar.

3. B. pyocyaneus bewirkt den Zerfall des Salicylins, wobei die Glucose zerstört wird und das frei gewordene Saligenin in Salicylsäure umgewandelt wird; damit ist der Oxydationsprozeß beendigt.

4. B. pyocyaneus bewirkt einen weitgehenden Zerfall des Tyrosins.

5. B. pyocyaneus bewirkt den Abbau des Tryptophans bis zum Ammoniumcarbonat, wobei, wie es scheint, aus dem Indol Anthranilsäure entsteht.

6. B. pyocyaneus zersetzt sehr langsam das Indol, indem er aus dem letzteren Ammoniumcarbonat bildet.

7. B. pyocyaneus zerlegt die Anthranilsäure bis auf Ammoniumcarbonat; er zersetzt aber die Para- und Metaaminobenzoesäure nicht.

8. Die Para- und Metaamidobenzoesäuren, ebenso wie die Ortho- und Metaamidozimtsäuren können weder als Kohlen- noch als Stickstoffquellen von B. pyocyaneus ausgenutzt werden.

9. Die zyklischen ebenso wie die aliphatischen Aminosäuren werden von B. pyocyaneus abgebaut, wobei zuerst die Gruppe COOH zerstört wird und NH_3 entsteht, was die Alkalisierung des Nährbodens zur Folge hat.

Literatur.

R. Appelmans, C. r. Soc. Biol. **85**, Nr. 29, S. 725, 1921. — *W. Bell*, Journ. of Inf.-Dis. **29**, Nr. 4, S. 424, 1921. — *R. Burri* und *P. Andrejew*, C. r. Soc. Biol. **1**, Nr. 56, S. 217, 1910. — *A. Berthelot*, C. r. Acad. Scienc. Nr. 169, S. 196, 1917. — *A. Breslauer*, Zeitschr. f. Gär.-Physiol. **4**, 353, 1914. — *H. Braun* und *Cahn-Bronner*, diese Zeitschr. **120**, H. 3/4, S. 226, 1922. — *R. Chodat* und *F. Weiss*, C. r. Soc. de Gen. **89**, Nr. 1, S. 22, 1922. — *Condelli*, Chem. Centralbl. **1914**, S. 1208. — *Dobrowolski*, Amer. Journ. Inf.-Dis. **24**, 595, 1910. — *Fieber*, Zeitschr. f. Bact. **87**, Nr. 4, S. 254, 1921. — *A. Fischer*, diese Zeitschr. **70**, 105, 1915. — *P. Fabry*, C. r. Soc. Biol. **85**, Nr. 32, S. 884, 1921. — *Gilbert Fowler* und *Arden Lochett*, Prot. of Roy. Soc. **88**, Nr. 562, S. 149, 1910. — *Giacomo*, C. r. Soc. Biol. **67**, 720, 1909. — *H. Hoen*, diese Zeitschr. **105**, H. 4/6, S. 169, 1920; Fermentforsch. **4**, Nr. 4, S. 301, 1921. — *E. Herzfeld* und *R. Klinger*, Centralbl. f. Bakt. **76**, 81, 1915. — *K. Kurona*, diese Zeitschr. **108**, H. 1/4, S. 424, 1922. — *Kaufmann*, Zeitschr. f. angew. Chem. **32**, 199, 1919. — *Krumwide* und *C. Prutt*, Journ. of Inf.-Dis. **18**, 438, 1913. — *H. Kumagawa*, diese Zeitschr. **130**, H. 1/2, S. 157, 1922. — *A. Liot*, Ann. Inst. Pasteur **37**, 234, 1923. — *W. Logie*, Journ. of Path. and Bact. **23**, Nr. 2, S. 224, 1920. — *E. Long*, Amer. rev. of Tuberc. **5**, Nr. 2, S. 857, 1922. — *E. Metschnikoff*, Ann. Inst. Pasteur **24**, 755, 1910. — *M. Neisser*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 1384. — *J. Narton* und *M. Samyer*, Journ. of Bact. **6**, 471, 1921. — *Nachtergoel*, C. r. Soc. Biol. **83**, Nr. 27, S. 1239, 1920. — *M. Rhein*, diese Zeitschr. **87**, 123, 1918. — *Derselbe*, C. r. Soc. Biol. **82**, 138, 1919. — *C. Stapp*, diese Zeitschr. **120**, H. 1/3, S. 42, 1923. — *Sasaki*, ebendaselbst **59**, 429, 1914. — *Sasaki* und *Otsuka*, ebendaselbst **121**, 167, 1921. — *Sasaki*, Journ. of Biochem. **2**, Nr. 2, S. 251, 1923. — *G. Salus*, Centralbl. f. Bact. **88**, Nr. 2, S. 103, 1922. — *F. Sicke*, Zeitschr. f. Hyg. **94**, 214, 1921. — *R. Wagner*, Zeitschr. f. Gär.-Physiol. **4**, 289, 1914. — *H. Zipfel*, Centralbl. f. Bakt. **1**, Nr. 64, S. 650, 1912.

Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung.

Bemerkungen zu der Arbeit von *Paul Liebesny* in Bd. 144 dieser Zeitschrift.

Von

J. Abelin.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 22. Februar 1924.)

Vor 1½ Jahren habe ich zum erstenmal darüber berichtet, daß nach Darreichung von einigen innersekretorischen Produkten, besonders aber nach Thyreoideazufuhr die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungsstoffe in ganz charakteristischer Weise verändert wird[1]). Im Bd. 137 dieser Zeitschrift habe ich die Frage der spezifisch-dynamischen Wirkung einer eingehenden Analyse unterworfen. An Hand von etwa 200 Gaswechselversuchen konnte dort gezeigt werden, daß die spezifisch-dynamische Wirkung ein feines Reagens für Stoffwechselveränderungen darstellt. Nach Aufnahme von Schilddrüsensubstanz reagierten die Tiere (Ratten) auf die Zufuhr gleicher Fleischmengen mit einer doppelt bis dreifach so hohen Stoffwechselsteigerung als in normalem Zustande. In ähnlichem Sinne, aber etwas schwächer, wirkte auch die Injektion von Tyramin und Phenyläthylamin sowie Adrenalin. Auf die diagnostische Bedeutung dieser Veränderung der spezifisch-dynamischen Wirkung habe ich in meiner Arbeit ausdrücklich hingewiesen (S. 279). *P. Liebesny* berichtet nun in einer großen Reihe von sorgfältig durchgeführten Untersuchungen über das Verhalten der spezifisch-dynamischen Wirkung der Eiweißkörper unter normalen und pathologischen Bedingungen. Meine Arbeiten über die spezifisch-dynamische Wirkung werden aber merkwürdigerweise nicht erwähnt. Wenn *Liebesny* angibt, daß „der Zweck der Untersuchungen war, festzustellen, ob ... eine Beeinflussung der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung durch das endokrine System erweisbar ist" (S. 316), so hat er dabei einen Weg eingeschlagen, der von mir bereits betreten wurde.

Auch die große „*Bedeutung des vegetativen Nervensystems für die spezifisch-dynamische Wirkung der Eiweißkörper*" (S. 296 meiner Arbeit, Sperrdruck im Original) habe ich mehrfach hervorgehoben. Sie geht wohl aus dem Titel meiner Mitteilung: „*Vegetatives Nervensystem und spezifisch-dynamische Wirkung*" ohne weiteres hervor. Und wenn daher *Liebesny* bei der Zusammenfassung seiner Versuchsergebnisse zum Schluß kommt, daß „eine Reihe von Beobachtungen darauf hindeutet, daß die spezifisch-dynamische Eiweiß-

---

[1]) *J. Abelin*, Über die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungsstoffe. Klin. Wochenschr. 1922, S. 2188. Vgl. auch den Vortrag in der 103. Jahresversammlung der Schweizer. Naturf.-Ges. am 24. August 1922.

wirkung mit der Einstellung des autonomen Nervensystems im Zusammenhang steht" (S. 349), so kann ich eine solche Bestätigung meiner Ansicht nur begrüßen. Ich darf es um so mehr tun, als die Untersuchungen von *Liebesny* an einem ausgedehnten klinischen Material durchgeführt wurden, während ich mich aus äußeren Umständen nur auf den Tierversuch beschränken mußte. Warum nun meine Befunde in der Arbeit von *Liebesny* keine Berücksichtigung fanden, bleibt mir unverständlich.

Die Veröffentlichung der Arbeit von *R. Plaut*[1]) und meine Mitteilung in der Schweiz. Naturf.-Vers. 1922 erfolgte fast gleichzeitig. Die Fragestellung bei den Untersuchungen von *R. Plaut* und bei meinen Arbeiten ist nicht ganz die gleiche.

Auf die weitere Bedeutung der spezifisch-dynamischen Wirkung will ich hier nicht näher eingehen. Ich verweise in dieser Beziehung auf meinen zusammenfassenden Artikel in der *Klinischen Wochenschrift* 1923, S. 2221.

Seit der Veröffentlichung meiner letzten Arbeit habe ich gemeinsam mit *Kenz. Miyazaki* eine große Anzahl weiterer Versuche über die spezifisch-dynamische Wirkung ausgeführt. Es wurden verschiedene Eiweißkörper, verschiedene Kohlehydrate sowie animalische und vegetabilische Fette auf ihre spezifisch-dynamische Wirkung vor und nach Schilddrüsendarreichung geprüft. Die einzelnen Hexosen wirken nicht gleichartig spezifisch-dynamisch. Die Glucose wirkt anders als die Fructose. Nicht ohne Interesse sind ferner die Verhältnisse beim Fett. Es hat normalerweise fast keine spezifisch-dynamische Wirkung. Nach Verfütterung von Schilddrüsensubstanz sahen wir aber eine spezifisch-dynamische Fettwirkung von 9, 14 sogar 17 Proz. Unter dem Einfluß von Thyreoideaeingabe sowie bei endokrinen Störungen treten also bei der spezifisch-dynamischen Wirkung ganz *neue Momente* auf. Die normalerweise hochwirksamen Eiweißkörper können z. B. bei Hypophysenerkrankungen fast gar keine spezifisch-dynamische Wirkung entfalten, und umgekehrt können die sonst wenig wirksamen Fette nach Thyreoideazufuhr erhebliche Stoffwechselsteigerungen veranlassen. All diese Fragen müssen noch näher erforscht werden. So viel steht aber jetzt schon fest, daß wir in der spezifisch-dynamischen Wirkung der Nahrungsstoffe eine Reihe von physiologisch und pathologisch hochwichtigen Vorgängen vor uns haben.

---

[1]) *R. Plaut*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **89**, 285, 1922.

Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers.

Von

K. Dresel und H. Rothmann.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 24. Februar 1924.)

Vor kurzem ist von *Hagedorn* und *Jensen*[1]) eine neue Methode zur Mikrobestimmung des Blutzuckers angegeben worden, die darauf beruht, daß die Proteinstoffe des Blutes nach Zusatz von Zinkhydroxyd durch kurzes Kochen gefällt werden und anschließend die Reduktion von Ferricyanid durch den vorhandenen Zucker jodometrisch bestimmt wird.

Nach eingehender Prüfung dieser Methode können wir sagen, daß sie unbedingt der *Bang*schen Mikromethode überlegen ist. Sie gibt exaktere absolute Werte und ist technisch eher leichter auszuführen. Dieses Urteil beruht auf einer in Tausenden von Bestimmungen gewonnenen Wertschätzung der *Bang*schen Methodik. Doch das Bessere ist der Feind des Guten.

Als einen gewissen Nachteil der *Hagedorn-Jensen*schen Methode haben wir es empfunden, daß das Blut mit einer 0,1-ccm-Pipette abgenommen und in die Zinkhydroxydlösung ausgeblasen werden soll. So angenehm dieses Verfahren bei der Untersuchung von Serum ist, bietet es doch für die Entnahme am Menschen und am Tiere in manchen Fällen gewisse Schwierigkeiten. Besonders bei kleinen Tieren (Meerschweinchen, Mäusen usw.) ist es oft unmöglich, aus der Ohrvene genügend schnell das Blut in die Pipette laufen zu lassen, da es gerinnt, ehe die Pipette gefüllt ist.

Es scheint uns daher wichtig, daß die *Hagedorn-Jensen*sche Methode auch dann nicht an Genauigkeit einbüßt, wenn man sie in der Weise modifiziert, daß man das Blut, wie wir es von der *Bang*schen Methode her gewöhnt sind, in die *Bang*schen Löschpapierblättchen aufsaugt, das Gewicht des entnommenen Blutes mit Hilfe der jetzt in jedem gut eingerichteten Laboratorium vorhandenen Torsionswage — genauer als mit der 0,1-ccm-Pipette — bestimmt und nun das Blättchen in die Zinkhydroxydlösung überführt. Die Enteiweißung durch

---

[1]) *H. C. Hagedorn* und *B. H. Jensen*, diese Zeitschr. **185**, 46, 1923; **187**, 92, 1923.

3 Minuten langes Kochen kann sofort angeschlossen werden, da durch das Kochen der Zucker aus den Blättchen vollständig extrahiert wird, also nicht erst die Diffusion des Zuckers wie bei der *Bang*schen Methode abgewartet zu werden braucht.

Als Leerbestimmung kocht man dann ein Bangblättchen ohne Blut, weil eine gewisse Menge reduzierender Substanzen, die aber in einer der käuflichen Packungen die gleiche zu bleiben pflegt, auch in den Bangblättchen enthalten ist.

Doppelbestimmungen mit Blättchen und Pipette ergaben sehr gute Resultate (s. Tabelle I):

Tabelle I.

Art der Blutentnahme	Prozent Blutzucker								
Pipette . .	0,204	0,238	0,060	0,100	0,089	0,154	0,093	0,087	0,123
Blättchen .	0,200	0,246	0,060	0,099	0,083	0,154	0,097	0,089	0,121
		0,242	0,060					0,086	

Wieviel Blut in die Blättchen eingesaugt wird, hat auf den Ausfall der Bestimmung keinerlei Einfluß, nur muß der gefundene Wert mit $100/x$ multipliziert werden, um den Prozentgehalt des Blutzuckers zu berechnen, wobei $x =$ der Anzahl Milligramm Blut ist, in der die Bestimmung vorgenommen wurde (s. Tabelle II).

Tabelle II.

Nr.	Entnommene Blutmenge	Blutzucker	Nr.	Entnommene Blutmenge	Blutzucker
1	98 mg	0,246 Proz.	4	96 mg	0,089 Proz.
	88 "	0,242 "		65 "	0,086 "
2	107 "	0,060 "	5	117 "	0,194 "
	69 "	0,060 "		93 "	0,194 "
3	51 "	0,086 "			
	136 "	0,082 "			

Zusammenfassung.

Die *Hagedorn-Jensen*sche Methode zur Bestimmung des Blutzuckers übertrifft in jeder Beziehung die *Bang*sche Methode. Sie läßt sich ohne Einbuße an Genauigkeit auch in der Weise modifizieren, daß man das Blut nicht mit der Pipette, sondern mit den *Bang*schen Löschpapierblättchen entnimmt und mit der Torsionswage wiegt. Dies bietet gewisse Vorteile, weil dadurch die Blutentnahme beim Menschen und besonders bei kleineren Tieren erleichtert wird.

Zur Kenntnis des gelatinolytischen Leberferments.

Von

Tsou-Hia Hsü (Schantung, China).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 25. Februar 1924.)

Vor längerer Zeit hat *S. Hata*[1]) im hiesigen Laboratorium Versuche zur Isolierung des gelatinolytischen Leberferments angestellt. *Hata* fand, daß man das Enzym bei geeigneter, saurer Reaktion recht gut bei längerer Digestion bei Zimmertemperatur extrahieren kann. Am besten geeignet war eine siebentägige Digestion. Diese Fermentlösungen ließen sich durch Ammonsulfat etwas weiter reinigen. Durch Sublimat ließ sich das Enzym ohne Schädigung von einem großen Teil des begleitenden Eiweißes trennen. Auf Anregung von Herrn Professor Dr. *Martin Jacoby* habe ich die Versuche von *Hata* wieder aufgenommen und sie in einigen Punkten etwas weiter geführt.

Bekanntlich wird das Eiweiß durch proteolytische Enzyme der Leber bei verschiedener Reaktion gespalten. Wir haben uns im wesentlichen auf die Wirkungen beschränkt, welche bei saurer Reaktion erzielt werden.

Nach verschiedenen Vorversuchen, bei denen wir die geeignete Reaktion in gepufferten Phosphatlösungen ausprobierten, sind wir so vorgegangen, daß wir stets 1 ccm verschieden verdünnter Leberlösung zu 2 ccm einer 5proz. Gelatinelösung fügten, nachdem wir 0,3 ccm n/10 Salzsäure zugesetzt hatten. Die Gelatine war stets mit Chloroform gesättigt, außerdem wurden auf jede Probe drei Tropfen Toluol gebracht. Die Proben blieben immer über Nacht im Brutschrank und kamen dann in Eiswasser.

Wir bezeichnen mit + + + vollkommene Verflüssigung der Gelatine, + die Gelatine ist weich, — die Gelatine ist fest.

Zunächst schildere ich einige Versuche, bei denen eine Reinigung des Enzyms durch Aussalzung mit Ammonsulfat angestrebt wurde.

---

[1]) *S. Hata*, Zur Isolierung der Leberfermente, insbesondere des gelatinolytischen Leberferments. Diese Zeitschr. **16**, 383. 1909.

Hata hatte Leberlösungen untersucht, welche durch eintägige Digestion bei 38° gewonnen waren. Bei Aussalzung mit 33proz. Sättigung des Salzes hatte er kein Enzym aussalzen können. Wenn er aber das Filtrat dann auf 70proz. Sättigung brachte, so erhielt er einen wirksamen, in Wasser löslichen Niederschlag.

Ich überzeugte mich, daß aus einem älteren Lebersafte, der noch sehr gut wirksam war, es durchaus nicht gelang, durch Aussalzung mit Ammonsulfat wirksame Niederschläge zu erhalten, obschon ich die Sättigung sehr variierte. Bei frisch hergestellten Lebersäften hatte ich keine Schwierigkeiten.

Frisch geschlachtete Pferdeleber (etwa 450 g) wurde zerhackt, der Brei wurde mit der gleichen Menge Wasser vermischt, 2 ccm 10proz. Essigsäure und etwas Chloroform wurden zugefügt. Das Gemisch wurde bei ungefähr 0° aufbewahrt. Nach verschieden langer Zeit (bis 13 Tage) wurde der Saft abgepreßt und mit Ammonsulfat ausgesalzen. Stets wurde bei 50proz. Sättigung ein wirksamer Niederschlag erhalten. Der Niederschlag wurde in der gleichen Menge Wasser gelöst, wie die Menge des Lebersaftes beträgt, und nach dem Filtrieren geprüft. Wenn ich anstatt 50proz. Sättigung 60- oder 80proz. herstellte, wurden die Niederschläge nicht wirksamer. Aus vielen Versuchen gebe ich nur zwei Beispiele.

Nach 24stündiger Digestion in der Kälte wurde der Lebersaft filtriert und je 10 ccm wurden mit 10, 15 und 40 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Am nächsten Tage wurden die Niederschläge abfiltriert und in je 5 ccm Wasser aufgenommen und flitriert. Von dem Filtrate waren bereits 0,2 voll wirksam (+++), 0,1 —. Wurde der Lebersaft nach 13tägiger Digestion filtriert, so ergaben sich bei Halbsättigung 0,3 ccm +++, 0,2 +, 0,1 —. Wurde die Untersuchungslösung auf das Doppelte verdünnt, so waren 0,4+++, 0,3 —.

Zum Vergleich sei der negative Ausfall mit einem alten, aber an und für sich noch wirksamen Lebersafte wiedergegeben. Dieser Lebersaft war nach der Vorschrift von *Hata* in siebentägiger Digestion bei Zimmertemperatur gewonnen worden, indem 365 g frische Pferdeleber mit ebensoviel 0,85proz. Kochsalzlösung, 2 ccm etwa 37proz. Salzsäure und 2 ccm Chloroform versetzt wurden. Nach 7 Tagen wurde filtriert und der Saft in der Kälte aufgehoben. Nach 34 Tagen wurde der Saft geprüft. Es wurde bis 0,2 ccm herab geprüft und überall +++ gefunden, während die Kontrolle — war.

Derselbe Saft wurde wie oben mit Ammonsulfat ausgesalzen. Bei 50- und 60proz. Sättigung wurde ein reichlicher Niederschlag erhalten, während merkwürdigerweise bei 80proz. nur wenig Niederschlag ausfiel, obwohl nicht etwa fraktioniert ausgesalzen worden war.

Die aus 10 ccm Lebersaft gewonnenen Niederschläge wurden in je 5 ccm Wasser aufgenommen, die Lösungen filtriert und geprüft. Aber auch die größte geprüfte Dosis von 1,0 war —. Derartige Versuche waren sehr häufig angestellt worden, hatten aber stets —, also den gleichen negativen Erfolg.

Kurz sei erwähnt, daß bei der Ausfällung mit Trichloressigsäure es nicht gelang, wirksame Fermentlösung zu erhalten. Weder die

Filtrate noch die mit Wasser extrahierten Niederschläge gaben irgend eine gelatinolytische Wirkung.

Auch mit der von *Jacoby*[1]) zuerst für Enzymfällungen angegebenen Uranylacetatmethode habe ich versucht, das gelatinolytische Enzym zu fällen. *Rosell*[2]) hatte verschiedene Organextrakte auf trypsinoide und pepsinoide Wirkung gegenüber Fibrinflocken untersucht. Ich habe zunächst Lebersaft vom Pferde und vom Hunde, der gut wirksam war, mit gesättigter Lösung von Uranylacetat ausgefällt (auf 10 ccm Lebersaft 2 ccm gesättigte Uranylacetatlösung). Der Niederschlag wurde abfiltriert und in Wasser aufgenommen. Bei diesem Vorgehen war sowohl das ursprüngliche Filtrat ganz wenig wirksam oder unwirksam wie auch das Extrakt des Niederschlages stets unwirksam. Auch wenn ich mit der Uranylacetatmenge herunterging, wurde kaum ein besseres Resultat erhalten. Auch wenn ich gleichzeitig mit dem Uranylacetat ein Gemisch von Phosphaten und Carbonaten zufügte, wie *Rosell* es gemacht hatte, um das Uran zu entfernen und schwache alkalische Reaktion herzustellen, erhielt ich niemals wirksame Lösungen. Ferner hatte ich die Ausfällung mit Uranylacetat in Gegenwart von Phosphatgemischen (p_H 7,468 bis 6,813) vorgenommen. Auch hier wurden verschiedene Verdünnungen untersucht, die Niederschläge mit Wasser oder schwach alkalischen Phosphatlösungen oder mit ganz dünner Sodalösung extrahiert, die filtrierten Extrakte neutralisiert. Niemals gelang es, eine wirksame Lösung zu erhalten.

Einige Resultate, die wir mit Uranylacetat erhielten, seien kurz angeführt, wenn sie leider auch nicht konstant ausfielen. Vielleicht können sie aber für weitere Versuche einen Hinweis geben. Es schien auch, als ob verschiedene Lebersäfte sich nicht gleichmäßig verhielten. Wir hatten gesehen, daß einfache Zufügung von Uranylacetat zu Lebersaft ohne nachfolgende Filtration das Ferment nicht schädigt. Wir hielten es daher für möglich, daß bei der Ausfällung des Lebersaftes mit Uranylacetat das Enzym zwar in den Niederschlag geht, aber nicht mehr ohne weiteres löslich ist. In der Tat fanden wir fast immer, daß der in Wasser aufgeschwemmte Niederschlag noch gut wirksam war, aber nach der Filtration unwirksam. Ein einziges Mal erhielten wir jedoch ein negatives Resultat. Vielleicht verhalten sich die einzelnen Lebersäfte etwas verschieden, und die Wirksamkeit geht nach dem Ausfällen mehr oder weniger schnell verloren.

Auch eine andere Erscheinung, die von Interesse sein würde, haben wir leider noch nicht konstant feststellen können. Wenn man

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 135, 1900.

[2]) *Max Rosell*, Über Nachweis und Verbreitung intrazellulärer Fermente. Dissertation Straßburg 1901.

mit gesättigter Uranylacetatlösung Lebersaft ausfällte, konnten wir mehrfach, aber nicht konstant beobachten, daß zwar das Filtrat der Ausfällung und der mit Wasser extrahierte Niederschlag allein unwirksam waren, das Gemisch von beiden Fraktionen aber stark wirksam. Merkwürdigerweise gelang das aber nicht mit jedem Lebersafte. Es muß daher noch geprüft werden, ob es vielleicht auf das Alter des Lebersaftes ankommt. Sollte es sich bestätigen, daß zwei Faktoren, die für die Wirksamkeit des Enzyms notwendig sind, durch das Uranylacetat getrennt werden, wäre das ja von großem Interesse.

Eine gewisse Reinigung des gelatinolytischen Ferments gelang auch durch die Cholesterinmethode. Diese Versuche sind deswegen bemerkenswert, weil das Enzym durch das Cholesterin nicht ausgefällt wurde, sondern in das Filtrat ging, während ein Teil des begleitenden Eiweißes in den Niederschlag ging.

10 ccm Pferdelebersaft wurden mit 1 ccm 10proz. Kochsalzlösung und 1 ccm heißgesättigter, alkoholischer Cholesterinlösung ausgefällt. Das Cholesterin fiel klumpig aus. Die Filtration wurde nach etwa 10 Minuten vorgenommen, sie ging ziemlich langsam, man erhielt ein klares Filtrat. Als Kontrolle wurden 10 ccm desselben Lebersaftes mit 1 ccm 10proz. Kochsalzlösung und 10 ccm absolutem Alkohol versetzt.

Die Prüfung ergab:

Cholesterinausfällung	Kontrolle
0,2 ccm vollkommene Lösung (+++) .	0,2 +++
0,1 „ (—)	0,1 +
0 (—)	0 —

In einem anderen Versuche wurde auch die Kontrolle filtriert.

0,2 ccm +++	0,2 +++
0,1 „ —	0,1 —

In einem anderen Versuch wurden 20 ccm Lebersaft zunächst mit 20 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung auf Halbsättigung gebracht. Am nächsten Tage der Niederschlag abfiltriert und in 20 ccm Wasser aufgenommen: 0,5 +++, 0,4++, 0,3 —.

10 ccm des Restes wurden wie oben mit Cholesterin ausgefällt. Das Cholesterinfiltrat ergibt: 0,3 +++, 0,2 —.

Ferner wurde versucht, ob die Cholesterinausfällung am gleichen Lebersafte vielfach vorgenommen werden kann. Es ergibt:

Nach der ersten Ausfällung 0,2 +++, 0,1 —,
„ „ zweiten „ 0,2 +++, 0,1 ++, 0 —.

Endlich haben wir geprüft, wieviel ein Lebersaft, der trotz dreimaliger Cholesterinausfällung gut wirksam bleibt, an Eiweiß und an sonstigen stickstoffhaltigen Bestandteilen durch die Verarbeitung verliert. Lebersaft wurde in der beschriebenen Weise dreimal mit Cholesterin ausgefällt.

Der ursprüngliche Lebersaft enthielt:

0,61 Proz. Eiweiß-N und 0,26 Proz. Nichteiweiß-N.

Nach zweimaliger Cholesterinreinigung:

0,34 Proz. Eiweiß-N und 0,16 Proz. Nichteiweiß-N.

Trotzdem war die Wirksamkeit nocht recht gut. Sowohl nach der zweiten wie auch nach der dritten Ausfällung waren noch 0,2 ccm +++, 0,1 –.

In fortgesetzten Versuchen wird man die Uranyl- und die Cholesterinmethode weiter ausbauen müssen, um zu einem gut gereinigten gelatinolytischen Leberferment zu gelangen.

Über die chemischen Veränderungen des Organstoffwechsels bei Nierenerkrankungen mit besonderer Berücksichtigung der Uranvergiftung. I.

Von

Yoshiyuki Mikawa (Tokushima, Japan).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 25. Februar 1924.)

Im Anschluß an die Entwicklung der pathologischen Anatomie hat auch die experimentelle Pathologie in den letzten Jahrzehnten sich bemüht, die chemischen Abänderungen, welche der Organismus durch Krankheiten erfährt, zu lokalisieren. Man war bemüht, den Ort aufzusuchen, an dem die Abweichung von der Norm erkennbar ist und versuchte dann, den pathologisch abgeänderten Chemismus am eigentlichen Sitze der Krankheit zu studieren. Besonders geeignet für derartige Untersuchungen erschien die Nierenfunktion, weil hier eine besondere Lokalisierung der Erkrankung gegeben schien. Gerade für dieses Organ haben nun eine Reihe von Arbeiten, welche im Laboratorium von *Jacoby* ausgeführt worden sind, es wahrscheinlich gemacht, daß die bisherige Auffassung zu eng ist. Nach diesen Arbeiten muß man annehmen, daß auch bei den Nierenerkrankungen die Störung nicht nur die Niere trifft, sondern auch andere Organe beteiligt sind.

Zunächst studierte *Dünner*[1]) das von *Pohl*[2]) aufgestellte Krankheitsbild der experimentellen subakuten Urannephritis. *Pohl* hatte gezeigt, daß Urannitrat in der winzigen Dosis von 0,35 mg bei Kaninchen von mittlerem Gewicht nach subkutaner Injektion ein merkwürdiges Krankheitsbild hervorruft: In den ersten Tagen nach der Einspritzung bleibt die Menge des Urins, der Eiweiß enthält, unverändert und auch die täglichen N- und NaCl-Mengen bewegen sich innerhalb derselben Grenzen wie vorher, um aber dann nach etwa 7 bis 9 Tagen einen anderen Charakter anzunehmen. Es erfolgt nämlich eine recht starke Polyurie, die manchmal sogar das Doppelte, Dreifache und Vierfache der gewöhnlichen Harnmenge liefert. Mit der starken Polyurie geht eine *erhöhte* Ausschwemmung von N- und NaCl einher. Dieser Zustand bleibt mehr oder weniger bis zum Tode der Versuchstiere bestehen, der ungefähr nach 14 Tagen erfolgt. Der Urin enthält von Beginn der Vergiftung an Eiweiß, der prozentuale Gehalt geht allerdings

---

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 89.

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 67.

im Verlaufe der Krankheit entsprechend der Steigerung der Polyurie herunter; jedenfalls aber ist Albumen bis zum Tode der Kaninchen nachzuweisen. Besonders auffallend ist, daß die vergifteten Kaninchen in der Zeit der gesteigerten Ausscheidung an Wasser, N und NaCl nicht mehr Futter und auch nicht mehr Wasser zu sich nehmen. Bei dauernder Abnahme der Freßlust und stetigem Gewichtsverlust sterben die Tiere in vollkommen atrophiertem Zustand bei dauernder Harnsekretion. *Pohl* hatte angenommen, daß diese Symptome sich durch die Erkrankung der Niere erklären lassen. Dementsprechend glaubte er auch bei der anatomischen Untersuchung hinreichende Grundlagen für den veränderten Chemismus zu finden, er nahm schwere Veränderungen an. Diese anatomischen Befunde konnte *Baehr*[1]), der in *Aschoffs* Institut arbeitete, nicht bestätigen. Eingehend haben sich dann *Dünner* und *Siegfried*[2]) mit dieser Frage beschäftigt. Sie fanden zwar auch bei der subakuten Uranvergiftung Nierenveränderungen, indem sie die verschiedenen Grade einer rein tubulären Nierenentzündung beobachteten. In Übereinstimmung mit *Baehr* konnten sie feststellen, daß in den Harnkanälen im Gegensatz zu den *Pohl*schen Angaben stets die Epithelien erhalten sind, daß aber die Angabe von *Pohl*, daß die Harnkanälchen stark erweitert sind, bestätigt werden kann. *Dünner* und *Siegfried* führen nun aus, daß beim Vergleich des klinischen Bildes mit dem anatomischen Befunde sich mit Sicherheit ergibt, daß die Versuchstiere nicht an der Nierenerkrankung als solcher zugrunde gegangen sind. Man müsse eine Allgemeinvergiftung annehmen. Dabei kann zunächst unentschieden bleiben, ob diese Vergiftung der übrigen Organe eine Folge der Nierenschädigung oder eine direkte Giftwirkung ist. Während *Pohl* und *Dünner* die so charakteristischen Folgen der subakuten Uranvergiftung untersuchten, haben zahlreiche Forscher die akute Uranvergiftung studiert. Hier treten so schwere Veränderungen auf, der Verlauf ist ein so stürmischer, daß der Unterschied von anderen Vergiftungen nicht so charakteristisch ist.

Einen wesentlichen Fortschritt brachte dann die in *Jacobys* Laboratorium ausgeführte Arbeit von *Bartfeld*[3]). *Bartfelds* Untersuchungen bedeuten einen erheblichen Schritt in der Richtung der Erkenntnis der chemischen Körperveränderungen, welche jenseits der Niere bei Nierenerkrankungen sich etablieren. Drei Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche Veränderungen treten im Verlaufe der *Pohl*schen Erkrankung im Blut auf?
2. Erscheinen sie vor, mit oder nach den Veränderungen des Harns?
3. Wie verhalten sich Blut- und Harnbefunde quantitativ zueinander?

Durch solchen Vergleich der Blut- und Harnanalysen schien es möglich, die Frage zu entscheiden, inwieweit in einer Allgemeinerkrankung oder in der Nierenerkrankung das Wesen des Prozesses liegt. *Bartfelds* Versuche führten zu dem zwingenden Schlusse, daß extrarenale Veränderungen vorliegen müssen, die den Eiweißstoffwechsel beschleunigen müssen. Der Reststickstoffgehalt des Blutes steigt erheblich an, obwohl die Tiere infolge der Krankheit weniger Nahrung zu sich nehmen und die Tiere mehr Stickstoff ausscheiden als in der Vorperiode, d. h. der Eiweißzerfall des Körpers ist gesteigert. Dafür spricht auch die rasche Gewichtsabnahme, die nicht nur auf Wasserverlust beruhen kann. Die Erhöhung des N-Spiegels im Blute

---

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**.
[2]) Zeitschr. f. allgem. Pathol. u. Therapie **21**.
[3]) Diese Zeitschr. **129**, 1922.

ist nicht eine Folge einer Ausscheidung geringerer N-Mengen als in der Vorperiode, sondern umgekehrt, die vermehrte N-Ausscheidung durch die Niere ist die Folge des vermehrten Angebotes vom Blute aus.

Nach den Versuchen *Bartfelds* ist die *Pohl*sche subakute Nephritis eine Stoffwechselstörung mit starker Anreicherung der Stickstoffschlacken im Blut, während die Nieren unverminderte, meist gesteigerte Stickstoffmengen ausscheiden. Die Nieren sind auch geschädigt, aber ihre Erkrankung erklärt nur einen Teil der Symptome.

So ergibt sich denn zunächst die Frage, ob bei der *Pohl*schen subakuten Nephritis eine Änderung des Chemismus der anderen Organe zu beobachten ist. Wenn auch im allgemeinen die Verhältnisse bei normalen Tieren bekannt sind, so mußten natürlich doch zunächst Versuche am normalen Tiere angestellt werden, damit die Vergleiche mit den kranken Tierorganen unter genau gleichen Bedingungen angestellt werden können. Eine möglichst weitgehende Gleichmäßigkeit der Versuchsbedingungen ist schon deswegen notwendig, weil nach den Erfahrungen des Laboratoriums (*Dünner*, *Bartfeld*) die Uranvergiftung nicht immer gleichmäßig verläuft. So ist der Verlauf der Vergiftung anscheinend auch sehr von der Ernährung der Tiere abhängig.

Alle Versuche wurden am Kaninchen von mittlerem Gewicht angestellt. Die Tiere erhielten die gleiche Nahrung, welche ihnen aber nicht quantitativ zugeteilt wurde. Sie konnten nach Belieben fressen. Das Gewicht und der Harn wurden ständig kontrolliert. Die Tiere wurden durch Verbluten getötet, sobald das Krankheitsbild sich voll entwickelt hatte. Das gelang befriedigend.

Als wichtigstes Organ, das auch zugleich genug Material für die Untersuchung bietet, wurde die Leber zur Untersuchung ausgewählt. Sofort nach dem Tode wurde die Leber herausgenommen und die Gallenblase entfernt. Während die Leber sofort zerkleinert wurde, wurden die übrigen Organe besichtigt und zur mikroskopischen Untersuchung vorbereitet.

Von dem Leberbrei wurden dann sofort die nötigen Portionen abgewogen, bestimmt wurde immer der Trocken- und Wassergehalt, der Reststickstoff und die Autolyse.

Die Autolyse wurde so untersucht, daß Portionen von je etwa 5 g genau abgewogen und mit 20 ccm Wasser und 2 ccm Chloroform für 24 Stunden in den Brutschrank getan wurden. Dann wurden die Proben wie beim Reststickstoff weiterverarbeitet.

Die Untersuchung auf Reststickstoff geschah in der Weise, daß der Organbrei oder die Organaufschwemmung mit Wasser auf das zehnfache Volumen verdünnt wurden. Dann wurden 10 ccm 20proz. Trichloressigsäure zugesetzt, aufgekocht und nach dem Aufkochen noch einige Tropfen 10proz. Essigsäure zugefügt. Dann wurde heiß filtriert und mit warmem Wasser nachgewaschen. In den Filtraten wurde dann der Stickstoff bestimmt.

Aus dem Reststickstoff der Autolyseportionen und des frischen Materials konnte dann der Effekt der Autolyse ohne weiteres berechnet werden.

Alle Analysen wurden mindestens doppelt, meistens vierfach ausgeführt.

Bestimmungen bei normalen Kaninchen.

Um den Verlauf der Analysen klarzulegen, schildern wir zunächst die Bestimmungen bei normalen Kaninchen.

Versuch 1.

Sofort nach dem Verbluten wird die Leber fein zerkleinert und alle Wägungen ausgeführt.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes werden zwei Portionen abgewogen:

a) 2,8215 g,
b) 4,674 g.

Nach Erzielung der Gewichtskonstanz wiegt

a) 0,803 g,
b) 1,323 g.

Das entspricht einem Wassergehalt von

a) 71,89 Proz. } im Mittel 71,79 Proz., also einem Trockengewicht
b) 71,69 „ } von 28,21 Proz.

Der Gesamtstickstoff wurde in drei Portionen bestimmt, sie wogen:

a) 0,33 g,
b) 0,920 g,
c) 0,791 g.

Auf 100 g Leber berechnet, fand sich in

a) 3,144 g N,
b) 3,241 g N,
c) 3,252 g N,

im Mittel also 3,199 g N in 100 g Leber.

Der Reststickstoff wurde in vier Portionen bestimmt, sie wogen:

a) 4,645 g,
b) 5,019 g,
c) 4,603 g,
d) 4,765 g.

Auf 100 g Leber berechnet, fand sich in

a) 0,295 g,
b) 0,304 g,
c) 0,311 g,
d) 0,315 g,

im Mittel 0,306 g.

Der Autolysestickstoff wurde in zwei Portionen bestimmt:

a) 3,205 g,
b) 4,861 g.

Auf 100 g Leber fand sich in

a) 0,548 g,
b) 0,535 g,

im Mittel also 0,542 g.

Es beträgt also:

der Rest-N . . .	9,6	Proz. des Gesamt-N	vor der Autolyse
„ Eiweiß-N . .	90,4	„ „ „	„ „ „
„ Rest-N . . .	16,9	„ „ „	nach „ „
„ Eiweiß-N . .	83,1	„ „ „	„ „ „

Der Umfang der Autolyse findet seinen Ausdruck in der Zunahme des Rest-N. Diese Zunahme beträgt 7,3 Proz. des Gesamt-N. Genau nach dem hier wiedergegebenen Schema wurden die Analysen bei allen Versuchstieren ausgeführt. Bei einer Anzahl wurden auch noch Bestimmungen des Rest-N des Blutserums ausgeführt.

Bevor ich nun die Ergebnisse wiedergebe, ist es notwendig, die Vergiftungen der Versuchstiere zu schildern. In der Hauptsache habe ich, dem Gesamtplan der Arbeit entsprechend, die Kaninchen mit Uran vergiftet. Zum Vergleich wurden Tiere mit Aloin und mit Cantharidin vergiftet.

Die Methoden der Vergiftung.

a) *Die Uranvergiftung.*

Zur Uranvergiftung wurde immer Urannitrat verwandt. Bei Tier 1 und 2 wurden akute Vergiftungen vorgenommen, bei Tier 3 bis 6 subakute.

Uran 1. Ein normales Kaninchen (Gewicht 1675 g) erhält subkutan 1 ccm einer 0,35proz. Lösung von Urannitrat = 3,5 mg.

Am nächsten Tage wird es durch Verbluten getötet. Der aus der Blase gewonnene Urin (27 ccm) enthält 6 Prom. Eiweiß, Zucker und Blut.

Im Sediment findet man neben roten Blutzellen zahlreiche granulierte Zylinder.

Uran 2. Ein Kaninchen von 2395 g erhält subkutan 1,3 ccm derselben Lösung von Urannitrat = 4,45 mg (20. II. 1923).

21. II. 1923. Gewicht 2400 g, Harn 82 ccm, stark alkalisch, schwarzbräunlich, Eiweiß 1,5 Prom., Zucker —.
22. II. 1923. Gewicht 2265 g, Harn 90 ccm, Eiweiß 0,25 Prom., Zucker —.
23. II. 1923. Gewicht 2245 g, Harn 30 ccm, Eiweiß 0,6 Prom., Zucker +.
24. II. 1923. Gewicht 2220 g, Harn 60 ccm, Eiweiß 0,7 Prom., Zucker +.

Im Sediment zahlreiche granulierte Zylinder.

Uran 3. Ein Kaninchen von 2470 g erhält am 5. III. 1923 0,2 ccm von einer 0,35proz. Lösung = 0,7 mg Urannitrat.

6. III. 1923. 2361 g.
7. III. 1923. 2400 g.
8. III. 1923. 2341 g.
9. III. 1923. 2310 g = 130 ccm, stark alkalischer Urin, Albumen positiv, Saccharum negativ.
10. III. 1923. 2390 g, 220 ccm, Albumen + + +, Saccharum 0,6 Proz.
11. III. 1923. 2350 g, zwei Portionen, Urin 53 ccm, Albumen + + +, Saccharum + und 270 ccm Urin, Albumen +, Saccharum +.
12. III. 1923. 2340 g, 110 ccm, Albumen +, Saccharum —.
13. III. 1923. 2325 g, 110 „ „ + „ —.
14. III. 1923. 2200 g, 86 „ „ + „ —.

Das Tier wird durch Herzstich getötet.

Uran 4. Ein Kaninchen von 2160 g erhält am 16. III. 1923 0,2 ccm einer 0,35 proz. Lösung = 0,7 mg Urannitrat, Albumen —.

17. III. 1923.	2040 g,	Urin 115 ccm,	Albumen	—	Saccharum —
18. III. 1923.	2050 g,	„ 65 „	„	+++	„ —
19. III. 1923.	2005 g,	kein Urin			
20. III. 1923.	1940 g,	Urin 200 ccm,	Albumen	+++	Saccharum 1,3 Proz.
21. III. 1923.	1810 g,	Urin 190 ccm,	Albumen	++	Saccharum +
22. III. 1923.	2000 g,	„ 95 „	„	+	„ +
23. III. 1923.	1900 g,	„ 244 „	„	0,8 Prom.,	Saccharum +
24. III. 1923.	1870 g,	kein Urin			
25. III. 1923.	1870 g,	Urin 154 ccm,	Albumen	Spur,	Saccharum —
26. III. 1923.	1850 g,	„ 185 „	„	?	„ —

getötet durch Karotisverblutung.

Uran 5. Ein Kaninchen von 2170 g erhält am 3. IV. 1923 0,2 ccm einer 0,35 proz. Lösung = 0,7 mg Urannitrat.

4. IV. 1923.	2070 g,	Urin 25 ccm,	Albumen	—	Saccharum —
5. IV. 1923.	2212 g,	„ 150 „	„	—	„ —
6. IV. 1923.	2230 g,	„ 120 „	„	+++	„ +
7. IV. 1923.	2210 g,	„ 150 „	„	++	„ —
8. IV. 1923.	2150 g,	„ 70 „	„	+	„ —
9. IV. 1923.	2000 g,	„ 105 „	„	+	„ —
10. IV. 1923.	1890 g,	„ 65 „	„	+	„ —
11. IV. 1923.	1845 g,		„	+	„ —

getötet durch Karotisverblutung.

Uran 6. Ein Kaninchen von 2080 g erhält am 6. IV. 1923 0,2 ccm einer 0,35 proz. Lösung = 0,7 mg Urannitrat.

7. IV. 1923.	2007 g,	Urin 70 ccm,	Albumen	—	Saccharum —
8. IV. 1923.	1980 g,	„ 30 „	„	+	„ —
9. IV. 1923.	1925 g,	„ 90 „	„	+	„ +
10. IV. 1923.	1905 g,	„ 32 „	„	+	„ +
11. IV. 1923.	1925 g,	„ 8 „	„	++	„ +
12. IV. 1923.	1780 g,	„ 40 „	„	+	„ —
13. IV. 1923.	1590 g,	„ 130 „	„	+	„ —

getötet durch Karotisverblutung.

Diese Protokolle der Uranvergiftung geben ein recht klares Bild und bilden eine geeignete Grundlage für die chemischen Untersuchungen. Da ich nur einwandfreies Material untersuchen wollte, habe ich alle Kaninchen getötet und nicht spontan sterben lassen. Der klinische Verlauf zeigt überall klar, daß die im hiesigen Laboratorium wohlbekannte Uranvergiftung in typischer Weise eingetreten ist. Bei den Tieren 3 bis 6 sieht man überall Polyurie, Albuminurie, Gewichtsverlust, vorübergehende Glykosurie. Bei Tier 1 und 2 sind die Dosen so gewählt, daß die Vergiftung möglichst akut abklingt. Hier wäre der Tod sehr bald eingetreten. Auch hier waren die wesentlichen Symptome der Vergiftung vorhanden, außerdem das Harnbild einer schweren Nephritis.

In Tabelle I will ich nun die bei der chemischen Untersuchung erhaltenen Normalwerte und die Werte bei der Uranvergiftung nebeneinanderstellen.

Tabelle I.

	Rest-N	Eiweiß-N	Rest-N	Eiweiß-N	Zunahme des Rest-N bei der Autolyse
	vor der Autolyse		nach der Autolyse		
	in Prozenten des Gesamt-N				
Normal 1 . .	9,6	90,4	16,9	83,1	7,3
„ 2 . .	13,0	87,0	19,8	80,2	6,8
Uran 1 . . .	9,8	90,2	23,2	76,8	13,4
„ 2 . . .	10,8	89,2	22,4	77,6	11,6
„ 3 . . .	5,9	94,1	27,4	72,6	21,5
„ 4 . . .	6,8	93,2	26,4	73,6	19,6
„ 5 . . .	8,2	91,3	21,0	79,0	12,8
„ 6 . . .	10,1	89,9	31,0	69,0	20,9

Vergleicht man die erhaltenen Zahlen, so ergibt sich ohne weiteres, daß eine Regelmäßigkeit sich in der letzten Rubrik findet. Sie zeigt an, daß die Zunahme des Rest-N bei der Autolyse in allen Einzelfällen, sowohl bei der akuten (1 bis 2) wie bei der subakuten (3 bis 4) Urannephritis eine wesentlich größere als in der Norm ist. Im Durchschnitt beträgt sie in der Norm 7,05, bei den Urantieren 16,6 Proz.

Ich gebe hier zunächst die Beobachtungen wieder. Sie bedeuten, daß bei den Urantieren eine Verstärkung der Autolyse besteht. Auf die Bewertung der Beobachtung werde ich später zurückkommen.

Um zu prüfen, ob auch bei der Einverleibung anderer Substanzen, die auf die Nieren einwirken, sich ähnliche Befunde wie bei der Uranvergiftung beobachten lassen, habe ich noch eine Anzahl Versuche mit Aloin und mit Cantharidin gemacht.

b) *Aloinvergiftung.*

1. Einem Kaninchen von 2050 g wird 0,05 g Aloin subkutan injiziert (17. IV. 1923).

18. IV. 1923. 2050 g, 50 ccm Urin
19. IV. 1923. 2000 g, 3 „ „
20. IV. 1923. 1965 g, 65 „ „
21. IV. 1923. 1890 g, 18 „ „
22. IV. 1923. 1900 g, 22 „ „
23. IV. 1923. 1850 g, 3 „ „

Im Harn wurde niemals Eiweiß oder Zucker nachgewiesen.
Das Tier wurde durch Verbluten getötet.

2. Einem Kaninchen von 2352 g wird 0,05 g Aloin subkutan injiziert.

21. IV. 1923. 2360 g, kein Urin
22. IV. 1923. 2020 g, 82 ccm Urin
23. IV. 1923. 2210 g, 60 „ „

Es wird 0,1 g Aloin injiziert.

24. IV. 1923. 2150 g, kein Urin
25. IV. 1923. 2090 g, 50 ccm Urin
26. IV. 1923. 2125 g, 26 „ „

Im Harn wurde niemals Eiweiß oder Zucker nachgewiesen.
Das Tier wird durch Verblutung getötet.

c) *Cantharidinvergiftung.*

Cantharidin 1. Einem Kaninchen von 2200 g wird mit Wasser verdünnte Tinctura cantharidum (2 : 8) subkutan injiziert. Gehalt höchstens 0,5 mg Cantharidin (26. IV. 1923).

27. IV. 1923. 2120 g, 54 ccm Harn
28. IV. 1923. 2130 g, 65 „ „

Wiederum Injektion derselben Dosis.

29. IV. 1923. 2070 g, 92 ccm Harn
30. IV. 1923. 2040 g, 10 „ „

Wiederholung derselben Injektion.

1. V. 1923. 1970 g, 4 ccm Harn
2. V. 1923. 1930 g, 27 „ „

Im Urin niemals Eiweiß oder Zucker.

Das Tier wird getötet.

Cantharidin 2. Einem Kaninchen von 1900 g wird von dem Cantharidinpräparat subkutan injiziert 1 mg (2. V. 1923).

3. V. 1923. 1850 g, kein Harn.

Wiederholung der Injektion.

4. V. 1923. 1770 g, kein Harn
5. V. 1923. 1797 g, „ „
6. V. 1923. 1805 g, 12 ccm, spezifisches Gewicht über 1060, Albumen ++, Saccharum –.
7. V. 1923. 1895 g, 28 ccm, spezifisches Gewicht 1038, Albumen ++, Saccharum –.

Wiederholung der Injektion.

8. V. 1923. 1800 g, 32 ccm. Im Harn viele granulierte Zylinder. Albumen ++, Saccharum –.

Das Tier wird getötet, das Unterhautzellgewebe ist stark ödematös.

Cantharidin 3. Einem Kaninchen von 1900 g wird 1 mg des Cantharidinpräparats subkutan injiziert (9. V. 1923).

10. V. 1923. 1810 g, 28 ccm Urin
11. V. 1923. 1780 g, 240 „ „

Wiederholung der Injektion.

12. V. 1923. 1745 g, 170 ccm Urin
13. V. 1923. 1830 g, 36 „ „
14. V. 1923. 1800 g, 54 „ „

Wiederholung der Injektion.

Im Harn granulierte Zylinder.

15. V. 1923. 1705 g, 120 ccm, einige granulierte Zylinder.

Der Urin stets frei von Albumen und Saccharum. Nur am 14. V. 1923 Spur Albumen.

Das Tier wird getötet. Im Uterus mehrere Föten.

Cantharidin 4. Einem Kaninchen von 2300 g wird 0,3 mg Cantharidinum crystallisatum subkutan injiziert (17. V. 1923).

18. V. 1923. 2190 g, 75 ccm Harn, Albumen –
19. V. 1923. 2315 g, 160 „ „ „ –

1,0 mg Cantharidinum cryst.

20. V. 1923. 2215 g, 240 ccm Harn, Albumen –
21. V. 1923. 2250 g, 50 „ „ „ –
22. V. 1923. 2180 g, 140 „ „ „ –

2,0 mg Cantharidinum cryst.

23. V. 1923. 2210 g, 60 ccm Harn, spärliche granulierte Zylinder, Albumen +.

2,0 mg Cantharidinum cryst. injiziert.

24. V. 1923. 2075 g, 30 ccm Harn, mäßige Mengen granulierter Zylinder, Albumen +.

Im Harn war niemals Zucker.

Das Tier wird getötet.

Cantharidin 5. Einem Kaninchen von 3120 g wird 1,0 mg Cantharidinum cryst. subkutan injiziert (24. V. 1923).

25. V. 1923. 3120 g, kein Harn

26. V. 1923. 3060 g, 160 ccm Harn, ohne Eiweiß und Zucker.

1,0 mg Cantharidinum cryst.

27. V. 1923. 2965 g, Harn ohne Eiweiß und Zucker

28. V. 1923. 2920 g, 130 ccm Harn, Albumen +, Saccharum —

29. V. 1923. 2890 g, 100 „ „ „ —

30. V. 1923. 2790 g, 120 „ „ „ + Saccharum —

Niemals Zylinder im Harn.

Das Tier wird getötet.

Cantharidin 6. Einem Kaninchen von 2030 g wird 2,0 mg Cantharidinum cryst. subkutan injiziert (1. VI. 1923).

2. VI. 1923. 1930 g, 30 ccm Harn, Albumen +, keine Zylinder, Saccharum —.

3. VI. 1923. 2050 g, 75 ccm Harn, Albumen —, keine Zylinder, Saccharum —.

4. VI. 1923. 1900 g, 130 ccm Harn, Albumen —, keine Zylinder, Saccharum —.

2,0 mg Cantharidinum cryst.

5. VI. 1923. 1840 g, 75 ccm Harn, Albumen —, spärliche Mengen granulierte Zylinder, Saccharum —.

Das Tier wird getötet.

Überblickt man die Protokolle der Vergiftungen mit Aloin und mit Cantharidin, so ist folgendes zu sagen: Diese Versuche sollen einen Vergleich für die Versuche mit Uranvergiftung bieten. Es sollte geprüft werden, ob die bei der Uranvergiftung gefundenen chemischen Veränderungen einen spezielleren Charakter tragen, oder ob sie sich etwa im allgemeinen bei Tieren finden, die eine veränderte Nierenfunktion zeigen.

Im einzelnen ist manches zur Kritik der Versuche zu sagen.

Die Alointiere waren zwar deutlich krank, aber die Erkrankungen waren nicht charakteristisch. Von den Cantharidintieren ist besonderer Wert auf die Versuche 4 bis 6 zu legen, da diesen Tieren kristallisiertes Cantharidin eingespritzt wurde. Die Cantharidinlösungen wurden nach der Vorschrift von *Ellinger* dargestellt[1]). Die Tiere wurden schwer krank. Ein Tier, das 3 mg Cantharidin erhielt, starb spontan an der Vergiftung und mußte daher für die chemische Untersuchung ausscheiden.

Die chemische Untersuchung bei den Alointieren und den Cantharidintieren ergab folgendes: Zum Vergleich beginnen wir wiederum mit den Werten, die wir bei normalen Tieren erhalten haben:

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 45, 1900.

Tabelle II.

	Rest-N	Eiweiß-N	Rest-N	Eiweiß-N	Zunahme des Rest-N bei der Autolyse
	vor der Autolyse		nach der Autolyse		
	in Prozenten des Gesamt-N				
Normal 1 . .	9,6	90,4	16,9	83,1	7,3
„ 2 . .	13,0	87,0	19,8	80,2	6,8
Aloin 1 . . .	10,8	89,2	23,1	76,9	12,3
„ 2 . . .	9,8	90,2	12,8	87,2	3,0
Cantharidin 1	18,4	81,6	46,5	53,5	28,1
„ 2	6,9	93,1	10,8	89,2	3,9
„ 3	7,3	92,7	22,6	77,4	15,3
„ 4	7,6	92,4	15,1	84,9	7,5
„ 5	8,0	92,0	17,4	82,6	9,4
„ 6	7,7	92,3	16,1	83,9	8,4

Einige weitere Tabellen mögen das analytische Material ergänzen. Zunächst werde ich in einer Tabelle die Trockengewichte der untersuchten Organe zusammenstellen, in einer anderen die Werte des Reststickstoffs des Blutes bei einigen Cantharidintieren.

Tabelle III.

	Wasser-gehalt	Trocken-substanz		Wasser-gehalt	Trocken-substanz
Normal 1 . . .	71,79	28,21	Aloin 1	71,89	28,11
„ 2 . . .	72,50	27,50	„ 2	70,65	29,35
Uran 1	69,28	30,72	Cantharidin 1 .	72,99	27,01
„ 2	71,03	28,97	„ 2 .	72,7	27,30
„ 3	71,04	28,96	„ 3 .	68,7	31,3
„ 4	74,90	25,10	„ 4 .	71,7	28,93
„ 5	70,89	29,11	„ 5 .	72,10	27,90
„ 6	71,71	28,29	„ 6 .	74,91	25,09

Tabelle IV.

	Rest-N in 100 ccm Blutserum
Cantharidin 3 . . .	42 mg
„ 4 . . .	62 „
„ 5 . . .	50 „
„ 6 . . .	45 „

Es handelt sich immer um das Blut, das den Tieren zum Zwecke der Verblutung entnommen wurde. Die Tiere waren also im Zustande fortgeschrittener Vergiftung.

Bei einer Reihe meiner Versuchstiere hatte Herr Dr. *Schönheimer* die Freundlichkeit, histologische Untersuchungen vorzunehmen. Es sei folgendes hervorgehoben:

Von den Urantieren wurde nur Tier 6 untersucht, das sichere Nierenveränderungen aufwies.

Von den Alointieren wurde Tier 2 untersucht, die Niere war ohne pathologischen Befund. Das angewandte Aloinpräparat war offenbar wenig wirksam.

Bei Cantharidintier 1 war Niere und Leber chronisch krank. In der Niere fanden sich starke Narben und kräftige kleinzellige Infiltration. Die Leber zeigte Zeichen der Cirrhose.

Das Cantharidintier 2 zeigte an der Niere nur Hyperämie der Rindenmarkgrenze, die Leber dieses Tieres wies Veränderungen auf, die wohl schon vor der Vergiftung bestanden hatten.

Bei Cantharidintier 3, das gravide war, war der Nierenbefund etwas stärker, die Leber frei.

Cantharidintier 4 zeigte sehr schwere Nierenveränderungen, in der Niere fanden sich frische Infiltrate, aber auch Leberinfiltrate waren nachweisbar.

Bei Cantharidintier 5 findet sich in der Niere trübe Schwellung der Epithelien, leichte Verfettung, ziemlich kräftige Hyperämie, Übergang in Nephrose.

Bei Cantharidintier 6 starke Hyperämie an der Rindenmarkgrenze, trübe Schwellung der Tubuli. Es findet sich Eiweiß und Zylinder.

Wesentlich an diesen histologischen Befunden ist vielleicht folgendes:

Das einzige Urantier, das histologisch untersucht wurde, zeigte in Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren Nierenveränderungen. Das untersuchte Aloïntier war histologisch ohne Nierenbefund. Das Präparat war wohl wenig wirksam. Von den Cantharidintieren sind die Tiere 4 bis 6 am wichtigsten. Diese Tiere sind im Gegensatz zu den Tieren 1 bis 3 ohne pathologische Vorgeschichte, hatten kristallisiertes Cantharidin injiziert erhalten und zeigen schwere histologische Nierenveränderungen.

Nunmehr muß das analytische Material genau besprochen werden.

Ich beginne mit den Reststickstoffwerten der Autolyse. Sie betragen bei den Normaltieren 9,6 und 13,0 Proz. des Gesamtstickstoffs. Ich konnte mich mit diesen beiden Normaltieren begnügen, da aus der Literatur und aus den Erfahrungen des Moabiter Laboratoriums[1]) hinreichend bekannt ist, daß die Normalwerte nur mäßigen Schwankungen unterliegen. Es ist unverkennbar, daß bei meinen vergifteten Tieren im allgemeinen die Tendenz besteht, die Reststickstoffwerte der frischen Leber nach unten gleiten zu lassen. Mit Ausnahme des Cantharidintieres 1 finde ich normale oder niedrige Werte.

Im Wassergehalt finde ich eigentlich nirgends erhebliche Abweichungen von der Norm. Die Reststickstoffwerte des Blutserums der Cantharidintiere sind erhöht. Sie sind nicht außerordentlich hoch und die Erhöhung ist auch nicht verwunderlich, da es sich um Nierenerkrankungen bei den Tieren handelte.

Unser Interesse muß sich auf die Zunahme des Reststickstoffs bei der Autolyse konzentrieren. Diese Zunahme drückt ja aus, daß der autolytische Prozeß in den Organen der betreffenden Tiere ein gesteigerter ist. Wie wir schon oben gesehen haben, findet sich bei den Urantieren in allen Fällen eine ganz erhebliche Steigerung gegenüber der Norm. Berechnet man eine Durchschnittszahl, so kommt man auf eine Erhöhung der normalen Zunahme

---

[1]) In acht Protokollen des Laboratoriums fanden sich keine Schwankungen, die größer waren, als die meiner beiden Normaltiere. Auch die Autolysenwerte sind im allgemeinen auffallend konstant, wenn nicht pathologische Verhältnisse vorliegen.

von 7,1 Proz. auf eine Zunahme von 16,6 Proz., also auf mehr als das Doppelte. Da aber die einzelnen Vergiftungsfälle nicht gleichwertig sind, so bedeuten Durchschnittszahlen nicht allzuviel. Wichtiger ist, daß selbst der niedrigste Wert 11,6 Proz. Zunahme sich von dem höheren Normalwert 7,3 erheblich entfernt und daß die Werte (11,6, 12,8, 13,4, 19,6, 21,5) bis zum Dreifachen des Normalwertes sich erheben. Im Gegensatz dazu finden sich bei den anderen Vergiftungen keine konstanten Werte und insbesondere nicht überwiegend Steigerungen.

So komme ich zu der Ansicht, daß die bei der Uranvergiftung beobachteten Erscheinungen eine besondere Bedeutung besitzen, der wir genauer nachspüren müssen.

Man muß an die Feststellungen *Bartfelds* anknüpfen. *Bartfeld* hat gezeigt, daß bei der subakuten Urannephritis der Harn gleichzeitig erhebliche Mengen an Stickstoff ausscheidet und das Blut stark mit Reststickstoff überladen ist. Es ist also nicht die Niereninsuffizienz als Erklärung ausreichend. Man kommt nicht damit aus, eine Anhäufung von Stoffwechselprodukten im Blut anzunehmen, sondern man muß daran denken, daß die Organe ihre Abgaben an das Blut über das normale Maß steigern. Es muß also ein erhöhter Abbau von Gewebssubstanz angenommen werden. In der gesteigerten Autolyse findet man nun in der Tat die durch *Bartfelds* Befunde zu erwartende Veränderung der Gewebe.

Wir müssen uns vorstellen, daß direkt durch die Vergiftung oder indirekt durch Reize, die infolge der Vergiftung auf die Leber einwirken, das Lebergewebe so verändert wird, daß die Eiweißsubstanzen mehr zum Zerfall neigen. Ob dabei das Eiweiß als solches labiler ist, man also bei der Vergiftung mit einer größeren Labilität des Eiweiß zu rechnen hat oder ob die proteolytischen Enzyme wirksamer sind, ist eine Frage, die wieder besondere Bearbeitung erfordert.

Die hier beschriebene neue Beobachtung hat bereits Analoga in der Pathologie. Zuerst hat *Jacoby*[1]) gezeigt, daß bei der Phosphorvergiftung die Autolyse der Leber erheblich gesteigert ist. Allerdings steht bei der Autolyse der mit Phosphor vergifteten Leber nicht die gesteigerte Eiweißzersetzung gegenüber der normalen Leber unter den gleichen Versuchsbedingungen im Vordergrunde. Die Autolyse nimmt einen intensiveren Verlauf, indem mehr Ammoniak gebildet wird. *Neuberg* und *Richter* haben es sehr wahrscheinlich gemacht, daß bei der akuten gelben Leberatrophie des Menschen sich ganz ähnliche Änderungen der Autolyse wie bei der Phosphorvergiftung finden. Nach den Arbeiten von *Neuberg*, *Blumenthal* und ihren Mitarbeitern wird auch beim Carcinom mit Abänderungen der proteolytischen Funktionen der Gewebe zu rechnen sein. Dementsprechend fanden auch *Kossel* und *Wakemann* die Zusammensetzung des Carcinomeiweiß verschieden von der des Organeiweiß.

In der neueren Zeit sind noch eine Reihe weiterer wertvoller Befunde hinzugekommen. Ich nenne die bedeutsamen Arbeiten von *Pick* und *Hashimoto*[2]) über die Anaphylaxie, von *Hermann Freund* und *W. Laubender*[3]) über den Eiweißabbau in der Leber und seine Abhängigkeit vom Zentral-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 1900.

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **76**, 1914; Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **21**, 1914.

[3]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **99**, 1923.

nervensystem, von *H. Freund* und *F. Rupp*[1]) über den Reststickstoffgehalt der Leber nach unspezifischer Vorbehandlung. Auch die gleichzeitig ausgeführten Untersuchungen von *Bieling, Gottschalk* und *Isaak*[2]) haben wichtiges Material gebracht. Aus allen diesen Arbeiten geht, wie *Freund* und *Rupp* sich treffend ausdrücken, hervor, daß die Untersuchung des Reststickstoffs der Leber geeignet ist, in Abweichungen des Eiweißstoffwechsels Einblicke zu gewähren, wo die quantitative Untersuchung des Harnstickstoffs keine verwertbaren Ausschläge gibt. Solche Abweichungen des Eiweißstoffwechsels haben sich allmählich bereits bei den verschiedensten Formen der Umstimmung des Organismus nachweisen lassen.

Die bisher erzielten Resultate gestatten nun noch einen Schritt in der Analyse weiterzugehen. Man kann sich fragen, wie kommt die gesteigerte Autolyse bei den Urantieren zustande? Handelt es sich um eine sekundäre Stoffwechselstörung oder wirkt das Uran direkt auf die Autolyse? Die Entscheidung kann nur durch Reagenzglasversuche gefunden werden. Zu untersuchen ist, ob Zusatz von Uransalzen zur Leber extra corpus die Autolyse steigert. Ist das der Fall, so ist damit zwar nicht direkt bewiesen, daß auch die gesteigerte Autolyse der Leber der Urantiere eine direkte Giftwirkung ist, es kann und muß aber dann mit dieser Möglichkeit gerechnet werden.

Ich habe Versuche mit Kaninchen- und Pferdeleber gemacht. Stets wurde frische Leber benutzt. Die Kaninchen wurden durch Verbluten getötet, die Leber nach Entfernen der Galle sofort fein zerhackt, Portionen von 5 bis 10 g abgewogen, überall die gleiche Flüssigkeitsmenge — auf 10 g Leber 40 ccm —, ansteigende Uransalzmengen und 3 ccm Chloroform hinzugefügt. Die Proben kamen für 24 Stunden in den Brutschrank. Nach Beendigung der Digestion wurde, wie in den oben beschriebenen Versuchen, der nicht koagulable Stickstoff bestimmt. Die Resultate werden in der Tabelle V auf 100 g berechnet angegeben.

Die Ergebnisse der in der Tabelle V wiedergegebenen Versuche sind vollkommen eindeutig. Bei Kaninchen- und bei Pferdeleber steigern die Uransalze, und zwar in gleicher Weise das Urannitrat wie das Uranacetat die Autolyse der Leber. Auch die quantitativen Verhältnisse sind durchaus übersichtlich. Bis 4 g Salz auf 100 g Leber sieht man immer eine starke Steigerung, bei 8 g schon eine Abnahme der steigernden Wirkung. Schon 0,2 g auf 100 g Leber hat eine deutliche Wirkung. Die Wirkung findet auch statt, wenn die Reaktion in gepufferter Lösung neutral gehalten wird. Es kann also kein Zweifel darüber bestehen, daß Uransalze direkt die Leberautolyse steigern. Trotzdem läßt sich nicht ohne weiteres aus diesen Befunden zwingend der Schluß ableiten, daß auch die verstärkte Autolyse der Leber der an Uranvergiftung erkrankten Tiere auf eine direkte Uranwirkung zurückzuführen ist. Die den Tieren zugeführten Urandosen sind minimal klein. Die Vergiftung ist eine langsame. Man hat keinen Anlaß, anzunehmen, daß die gesamte zugeführte Urandosis überhaupt in der Leber abgelagert wird. So liegen also in der Leber des vergifteten Tieres

---

[1]) Ebendaselbst.

[2]) Klin. Arch. 1922; *Gottschalk*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **96**, 1923.

Tabelle V.

Nr.	Tierart	Menge jeder Probe g	Uransalz	Menge des Salzes auf 100 g Leber g	Nicht koagulabler N auf 100 g Leber a	b
1	Kaninchen	5	Nitrat	1	0,656	—
				0,2	0,492	—
				0	0,438	—
2	„	10	„	2	0,853	0,832
				1	0,646	0,696
				0,2	0,446	0,457
				0	0,402	0,410
3	Pferd	10	„	2	0,663	0,728
				1	0,544	0,618
				0,2	—	0,470
				0	0,380	0,398
4	„	10	„	2	0,705	0,721
				1	0,608	0,601
				0,2	0,476	0,477
				0	0,404	0,406
5	Kaninchen	9	„	8,8	0,742	0,731
				4,4	0,833	0,835
				2,2	0,760	0,765
				0	0,404	0,405
6	Pferd	10	Acetat	8	0,761	—
				4	1,019	—
				2	1,035	—
				0	0,754	—
7	„	10	„	8	1,176	1,236
				4	1,190	1,345
				2	1,348	1,342
				0	0,579	0,604
8	Kaninchen	10	„	8	0,537	0,508 *
				4	0,537	0,502
				2	0,547	0,561
				0	0,361	0,383
9	Pferd	10	„	8	0,824	0,735 *
				4	0,942	1,019
				2	0,940	0,857
				0	0,381	0,410

* Gepuffert als n/10 Natriumacetatlösung.

doch gänzlich andere Bedingungen als im Reagenzglas vor. Es ist also wahrscheinlich, daß es sich nicht um eine direkte Uranwirkung handelt, obwohl Uran als solches die Autolyse steigert. Bei der Phosphorvergiftung hat vor Jahrzehnten schon *Jacoby* darauf aufmerksam gemacht, daß es sich auch dort offenbar nicht um eine direkte Phosphorwirkung handelt. Wenn ich also auch bei der Uranvergiftung nicht annehme, daß es sich um eine direkte Uranwirkung auf die Leberautolyse handelt, wie ich sie im Reagenzglase nachgewiesen habe, so ist man natürlich andererseits dadurch noch nicht berechtigt, die Leberwirkung direkt als eine sekundäre Folge

der Nierenvergiftung anzusehen. Diese Frage läßt sich natürlich durch die vorliegenden Versuche noch nicht streng entscheiden.

Nachdem ich mich von der Steigerung der Leberautolyse durch Uransalze überzeugt hatte, schien es endlich noch von Interesse, auch zu untersuchen, ob auch qualitativ der Verlauf der Autolyse in Gegenwart der Uransalze abgeändert ist. Da *Jacoby* gefunden hatte, daß bei der Autolyse der Leber der mit Phosphor vergifteten Tiere der durch Magnesia austreibbare Amidstickstoff zunimmt, habe ich untersucht, ob das auch bei der Uranautolyse der Fall ist. Es war zu entscheiden, ob nur mehr Eiweiß abgebaut wird oder ob auch mehr tiefere Spaltungsprodukte bei der Eiweißspaltung entstehen.

Es wurden aus Kaninchen- und Pferdeleber Säfte bereitet, indem zu fein gehackter, frischer Leber die gleiche Menge Wasser zugefügt wurde, außerdem Chloroform und Toluol. Nach 24 Stunden Aufenthalt bei Zimmertemperatur wurde die Mischung koliert und von dem so gewonnenen Saft ein Teil mit Uranylacetat versetzt. Es wurden dann Portionen an verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Immer wurden je 20 ccm Lebersaft verarbeitet, indem der Saft mit einem Löffel Magnesia usta versetzt und durch die Mischung 30 Minuten Dampf geleitet wurde. Das entweichende Ammoniak wurde in n/10 Schwefelsäure aufgefangen.

Versuch 1.

345 g frische Pferdeleber wurde zerhackt, mit 345 ccm Wasser, 5 ccm Chloroform und 5 ccm Toluol versetzt. Die Mischung verbleibt 24 Stunden bei Zimmertemperatur und wird dann koliert.

4. I. Von dem Saft werden 200 ccm mit 2,0 g Uranylacetat und 200 ccm mit 2,0 g Kochsalz versetzt.

Wir geben die Resultate in Kubikzentimetern verbrauchter n/10 Säure.

	Uran	Kontrolle
5. I.	2,4	2,1
	2,8	2,2
Die Lösungen kommen in den Brutschrank.		
7. I.	3,1	2,7
	3,2	3,2
8. I.	3,2	3,0
	3,2	3,0
9. I.	3,6	3,5
	3,8	3,5

Versuch 2.

590 g frische Pferdeleber und 520 ccm Wasser und 5 ccm Chloroform und 5 ccm Toluol.

Nach 24 Stunden wird durch Kolieren 740 ccm Lebersaft gewonnen.

11. I. Es werden je 370 ccm Saft mit 3,7 g Uranylacetat und mit 3,7 g Kochsalz versetzt.

	Uran	Kontrolle
14. I.	2,2	2,4
	2,4	2,4
Die Lösungen kommen in den Brutschrank.		
16. I.	2,5	2,3
	2,7	2,5
19. I.	12,0	9,5
	12,2	10,1
22. I.	14,3	16,4
	14,6	16,7
Die Lösung hat sich schwarz verfärbt.		
24. I.	16,2	36,2
	16,4	36,5
28. I.	17,2	44,9
	17,3	45,2

Versuch 3.

105 g Leber eines durch Verbluten getöteten Kaninchens und 105 ccm Wasser und 5 ccm Chloroform und 5 ccm Toluol.

30. I. Nach 24 Stunden erhält man 130 ccm Saft, davon 65 ccm + 0,65 g Uranylacetat und 65 ccm + 0,65 g Kochsalz.

	Uran	Kontrolle
30. I.	1,2	1,1
	1,4	1,1
7. II.	2,0	2,0
	2,1	2,0

Nach diesen Versuchen bewirkt also Zusatz von Uranylacetat zu Leber keine sichere Steigerung des bei der Autolyse auftretenden, durch Magnesia abspaltbaren Stickstoffs. Ob eine Hemmung unter Umständen stattfinden kann, mag dahingestellt bleiben. Denn dies Zurückbleiben der Spaltung im zweiten Teile des Versuchs 2 will ich nicht verwerten, da die Leber sich stark verändert hatte. Es war zwar noch reichlich Chloroform und Toluol vorhanden, immerhin ist bei so starker Zersetzung Vorsicht geboten, ob nicht etwa nachträglich bakterielle Vorgänge eingegriffen haben. Jedenfalls besteht kein Hinweis auf eine Steigerung der autolytischen Amidspaltung durch Uran in vitro, die mit der bei der in vivo einsetzenden Phosphorvergiftung vergleichbar wäre. Man erkennt also immer mehr, daß zwar in sehr großen Zusammenhängen durchaus die einzelnen pathologischen Bilder verknüpft sind, daß aber doch jede Vergiftung auch in ihrem Einfluß auf den Chemismus des Stoffwechsels ihr individuelles Gepräge trägt.

Zusammenfassung.

Es sollte mit chemischer Methode geprüft werden, inwiefern bei Vergiftungen, die mit Änderungen der Nierenfunktion einhergehen, auch andere Organe in ihrem Chemismus in Mitleidenschaft gezogen werden. Angeknüpft wurde an die bei der Uranvergiftung erhobenen Befunde. Hier hatte sich bei der subakuten Form der Vergiftung gezeigt, daß es trotz offener Nierenwege im Blute zu einer Ansammlung von Produkten des Organstoffwechsels kommt. Es war daher an-

zunehmen, daß der Stoffwechsel der Organe erhöht ist. In Analogie mit den Verhältnissen, wie sie namentlich von der Phosphorvergiftung her bekannt sind, war zu untersuchen, wie sich die Autolyse der Organe bei den Urantieren verhält. Es stellte sich heraus, daß bei den mit Uran vergifteten Tieren eine Steigerung der Autolyse nachzuweisen ist. Diese Steigerung ist sehr konstant und erreicht hohe Werte. Dagegen ist der Reststickstoff der Organe, die sofort ohne Autolyse nach dem Tode untersucht wurden, nicht konstant erhöht. Das ist verständlich. Denn es war ja beobachtet worden, daß eine reichliche Abfuhr stickstoffhaltiger Substanzen durch das Blut und die Harnwege stattfindet.

Vergleichsversuche mit Aloin und Cantharidin lehrten, daß sich durchaus nicht bei allen Nierenschädigungen dieselben Leberveränderungen nachweisen lassen. Insbesondere war beim Cantharidin, obwohl hier schwerste Nierenveränderungen gefunden wurden, eine Autolysensteigerung keineswegs regelmäßig nachweisbar. Sorgfältige histologische Untersuchungen, die in dankenswertester Weise von Herrn Dr. *Schönheimer* ausgeführt wurden, zeigten, daß Steigerung der Leberautolyse nicht etwa parallel der Schwere der Nierenveränderungen geht.

Jedenfalls kann man sagen, daß zum Krankheitsbilde der subakuten Uranvergiftung eine Labilität des Organeiweiß gehört. Dabei kann es zunächst gleichgültig sein, ob die proteolytischen Enzyme wirksamer sind oder das Eiweiß leichter spaltbar ist. Diese erhöhte Labilität des Organeiweiß, wie sie zuerst *Jacoby* bei der Phosphorvergiftung erkannt hat und die sich immer mehr als eine Erscheinung herausgestellt hat, die in der Pathologie eine bedeutsame Rolle spielt, ist als ein Faktor des pathologischen Gesamtbildes anzusehen, welches bei der Beurteilung der Vergiftung berücksichtigt werden muß.

Nachdem sichergestellt war, daß die Autolyse der mit Uran vergifteten Tiere gesteigert ist, wurde untersucht, ob Uran auch bei direktem Zusatz zur Leber die Autolyse steigert. Das ist in der Tat der Fall. Immerhin sind aber zu dieser Wirkung ziemlich erhebliche Dosen notwendig. Die geringen Dosen, die man dem lebenden Tiere zuführt, sind jedenfalls in vitro nicht imstande, eine Steigerung der Autolyse zu bewirken. Man muß sich hier also den Mechanismus der Wirkung anders vorstellen als bei der Einwirkung im Reagenzglase. Bemerkenswert ist, daß auch ganz große Dosen noch die Autolyse steigern, allerdings in geringerem Umfange als mittlere Dosen.

Besondere Versuche zeigten, daß der mit Magnesia austreibbare Stickstoff im Anfang der Autolyse bei den Urantieren nicht mehr zunimmt als bei den normalen Tieren. Nach dieser Richtung ist also qualitativ der Gang der Autolyse nicht gegen die Norm abgeändert.

Zur mikrochemischen Bestimmung der Lipoide nach J. Bang.

Von

H. Forster.

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 28. Februar 1924.)

Im Anschluß an die Arbeit von *J. Maas* in dieser Zeitschrift (Bd. 144, S. 379, 1924) möchte ich noch auf einige Punkte aufmerksam machen, die zur Aufklärung der zweifelhaften Ergebnisse, die man beim Arbeiten nach *Bangs* Methode zur Bestimmung der Lipoide im Blute erhält, dienen können.

Gleich zuerst möchte ich bemerken, daß ich beim Arbeiten nach obiger Methode ähnliche Erfahrungen machen mußte wie *J. Maas*.

Den Fehler, den man erhält durch das Ablösen der Fäserchen des Löschpapiers, auf dem man das Blut eintrocknen läßt, konnte ich dadurch verhindern, daß ich die Blättchen beim Vorpräparieren (Extraktion in Petroläther und Alkohol) gehörig im Extraktionsmittel schüttelte, wobei die Fäserchen zum größten Teil abfielen. Nimmt man fettfreies Filterpapier von Schleicher und Schüll, so wird der Bichromatverbrauch beim Leerversuch so groß (durch die sich ablösenden Fäserchen), daß er denjenigen der Blutproben übersteigt, was dann natürlich ganz unbrauchbare Resultate gibt. Man arbeite nur an staubfreien Orten.

Eine große Fehlerquelle fand ich dann auch in dem leidigen Überkriechen des Petroläthers beim Eindampfen. Dieses Überkriechen kann man vermeiden, ohne die Zeit zum Eindampfen ins Ungebührliche zu verlängern, indem man, wie *W. D. Treadwell* in seinem Lehrbuch der quantitativen Analyse angibt, das Abdampfgläschen oben mehr erwärmt als unten. *Treadwell* empfiehlt eine Heizschlange um das Gläschen zu legen, die oben enger anliegt als unten. Man erreicht dasselbe durch Erwärmen mittels Glühlampen, die man oberhalb der Gläschen anbringt. Ich machte mir eine Vorrichtung, die mir gestattete, zwei Glühlampen seitlich der Abdampfgläschen auf- und abwärts zu verschieben, wodurch ich leicht ein Überkriechen verhindern konnte.

Sorgt man dann noch für gehörigen Wärmeschutz durch Einsetzen in eine Kiste oder dergleichen, so kann das Eindampfen in einer Stunde beendigt werden, ohne daß der erwähnte Übelstand eintritt.

Ferner überzeuge man sich, ob der verwendete Petroläther den von *Bang* verlangten Siedepunkt besitzt (50 bis 65° C). Ich bekam z. B. einmal solchen geliefert, bei dem die Hälfte erst bei 85° C siedete und das letzte Drittel erst bei 90° C!

Man prüfe auch, ob die vorgeschriebenen 20 Tropfen KJ, die man zur Titration benötigen soll, genügen, um die zur Titration der überschüssigen Kaliumbichromatlösung nötige Menge Jod zu liefern.

Bedeutet A_1 die zur Titration der Leerbestimmung, A_2 und B die zur Titration der Parallelbestimmungen und C die zur Titration von 1 ccm n/10 Kaliumbichromatlösung verwendeten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung, so erhält man die in $^1/_{10}$ ccm Blut enthaltene Menge Cholesterin + Neutralfett oder Cholesterinester usw. durch die Formel:

$$\frac{2A_1 - (A_2 + B)}{2C} \cdot 0{,}4082.$$

Vorstehenden Beobachtungen liegt die Untersuchung eines großen Blutmaterials zugrunde, das mir von Herrn Dr. *Vogel* aus dem Sanatorium Guardaval zur Verfügung gestellt und das im Davoser Forschungsinstitut untersucht wurde.

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration in Gegenwart von Salzen auf das Wachstum von Gibberella Saubinetii.

Von

Henrik Lundegårdh.

(Aus der ökologischen Station auf Hallands Väderö, Schweden.)

(Eingegangen am 28. Februar 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In einer früheren Arbeit (*Lundegårdh*, 1923) habe ich einige Versuche über das Wachstum der Fusarien, unter anderem der obengenannten Art, in Lösungen verschiedener Wasserstoffionenkonzentration geschildert. Es zeigte sich dabei, daß die Pilze eine ziemlich große Anpassungsfähigkeit hatten, indem sie innerhalb der p_H-Grenzen 2,7 bis 8,4 sich entwickelten. Die reichste Entwicklung fand aber in der Nähe des Neutralpunktes statt, obwohl die Kurve, in Übereinstimmung mit früheren Befunden von *Webb* (1919) und *Hopkins* (1922), zwei Gipfel zu haben schien. Als Medium benutzte ich 2 proz. Peptonlösungen. Wegen der verhältnismäßig schwachen Pufferwirkung dieser Lösung und des starken Umstimmungsvermögens der Fusarien änderte sich aber das p_H ziemlich rasch, was die genaue Bestimmung der Kurve erschwerte. Um eine einigermaßen große Pilzernte zu bekommen, die eine zuverlässige Trockengewichtsbestimmung ermöglicht, muß man nämlich den Versuch ziemlich lange ausdehnen. Die Pilze regulieren inzwischen das p_H in Richtung gegen eine schwach alkalische Reaktion.

Bei meinen fortgesetzten Untersuchungen habe ich diese Schwierigkeit zum Teil in der Weise umgangen, daß nicht die Trockengewichtsbestimmung, sondern die Atmungsintensität der Pilze als Maß ihrer Entwicklung genommen wurde. Es war mir hierdurch möglich, das Wachstum von den ersten Anfängen an zu verfolgen, und ich konnte auch feste Medien, namentlich Boden wählen, was ja für die praktische Verwertung der Ergebnisse besonders bedeutungsvoll ist.

Über die biologische Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration ist in den letzten Jahren eine sehr umfangreiche Literatur entstanden, und man hat die p_H-Kurven von Bakterien, Pilzen, Keimlingen und fertigen Pflanzen bestimmt. Während man früher ausschließlich die direkte physio-

logische Wirkung des H'-Ions auf die Pflanze als Grund der starken Abhängigkeit von der Reaktion des Mediums auffaßte, so scheint in den letzten Jahren die Meinung sich zu verbreiten, daß die H'-Ionen die Löslichkeit oder Mobilisierbarkeit anderer Ionen beeinflussen und auf diese Weise auch indirekt sich an dem Gedeihen der Pflanze beteiligen. So nehmen beispielsweise *S. D. Conner* und *O. H. Sears* (1922), *W. H. Mac Intire* (1921), *W. R. G. Atkins* (1921) u. a. an, daß die Giftwirkung saurer Böden darauf beruht, daß sie leicht lösliche Al-Salze enthalten, oder daß die Konzentration der Ca-Ionen zu gering ist. Die Al-Ionen sollen nämlich in höheren Konzentrationen giftiger als die p_H-Ionen sein. (*Conner* und *Sears* 1922 über Gerste.) Ist diese Annahme richtig, so würde man also die Schädlichkeit saurer Böden dadurch vermindern können, daß man Ionen hinzugibt, die gegen Al antagonistisch sind. Die interessante Frage harrt noch der eingehenden Untersuchung, sogar die Hauptpunkte scheinen noch nicht ganz einwandfrei zu sein (vgl. z. B. *I. A. Denison*, 1922).

Sehr wenig untersucht ist ferner die außerordentlich wichtige Frage über den interferierenden Einfluß von anderen Ionen auf die physiologische Wirkung der H-Ionen. Die antagonistische Wirkung von gewissen Anionen und Kationen ist ja sonst ein sehr fleißig bearbeitetes Kapitel der Physiologie. Erst in den letzten Jahren sind einige Arbeiten erschienen, die sich allerdings nur in geringer Ausdehnung oder mehr gelegentlich mit der aufgeworfenen Frage befassen. *W. Brenner* (1920) fand bei Plasmolyseversuchen mit Epidermiszellen von *Tradescantia*, daß die tötende Wirkung von höheren H-Ionenkonzentrationen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Calciumionen in der Lösung abgestumpft wurde. *Vl. Úlehla* und *Vl. Morávek* (1921) haben bei der Untersuchung des Platzens von *Basidiobolus*-Hyphen in verdünnten Säuren gefunden, daß bei höheren Konzentrationen eines gleichzeitig gegebenen Salzes (NaCl) die Wirkung durchgehend unterdrückt wurde. Bei niederen Salzkonzentrationen wurde sie dagegen gefördert. Diese modifizierende Wirkung von Salzen auf die Giftwirkung der H-Ionen ist natürlich eine kolloidchemische Erscheinung und kann also bei allen physiologischen Prozessen erwartet werden. So finden auch *A. Jodlbauer* und *F. Haffner* (1920), daß die Anwesenheit von $Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$ und $Ca^{\cdot\cdot}$ die Wirkung verschiedener H-Ionenkonzentration auf die Wärmehämolyse modifiziert, und *G. Joachimoglu* (1923) findet, daß die desinfizierende Kraft von Sublimatlösungen auf Kolikulturen in saurer Lösung verstärkt wird. Mit *Bacterium coli* haben auch *J. M. Sherman* und *G. E. Holm* (1922) gearbeitet. Die Beeinflussung der p_H-Wirkung durch Natriumsalze ist beim Optimum der Kurve nur gering, tritt dagegen an den Grenzen sehr deutlich in Erscheinung. Hier, wo das Wachstum sehr verzögert ist, genügen beispielsweise Mengen von 0,20 Mol. NaCl, um das Wachstum stark zu befördern. Es wird also durch den Kochsalzzusatz die Wachstumsbreite des Kolibazillus erweitert. Natriumcitrat wirkt umgekehrt verengernd. Es ließen sich wahrscheinlich aus der neueren Literatur noch mehrere Beispiele auf diese antagonistische Wirkung von Salzionen auf die H-Ionen heraussuchen.

Da die Frage, wie gesagt, sowohl theoretisch wie auch praktisch, z. B. für die Düngungslehre, von sehr großer Bedeutung ist, so habe ich sie als Thema aufgenommen. In vorliegendem Aufsatz wird die interferierende Wirkung von H-Ionen und Salzen auf das Wachstum

von einem pathogenen Bodenpilz untersucht. In einer besonderen Arbeit werde ich ähnliche Versuche mit höheren Pflanzen schildern.

Methodisches.

Die flüssigen Kulturen wurden in gut ausgewaschenen Jenaerkolben (Erlenmeyertypus) von 100 bis 150 ccm Inhalt angelegt. In jeden Kolben kamen 20 ccm einer 2proz. Peptonlösung (Pepton *Witte*). Nach 30 Minuten Sterilisierung im Autoklav wurden die Kolben durch Hinzufügen von entsprechenden Mengen einer n/10 Salzsäurelösung auf ein bestimmtes p_H gebracht (ich ging hierbei natürlich nach einer empirisch ein für allemal aufgestellten Tabelle; die jeweilige Kontrolle des p_H fand erst nach Abschluß des Versuchs statt, wenn man genau arbeitet, sind aber die Schwankungen sehr gering). Dann wurden auch die zu prüfenden Salze als eine gewisse Menge sterilisierter Lösung hinzugefügt und erst nach einer Weile fand dann die Impfung aus einer Reinkultur statt. Die letztere war immer bis zur Sporenbildung fortgeschritten und mit der Platinnadel wurde die Sporenkruste leicht abgekratzt und das Anhaftende übergetragen. Die Impfkulturen waren entweder auf Kartoffelscheiben oder auf Pepton angelegt. Auf beiden Substraten wachsen die stark luftbedürftigen Pilze ausgezeichnet. Peptonagar ist dagegen nicht geeignet. Die Manipulationen bei dem Ansäuern usw. der Lösungen müssen sehr schnell und vorsichtig ausgeführt werden. Ich stellte die Büretten, die die Lösungen enthielten, dicht nebeneinander und schob über die Ausflußmündung eine weite, vorher sterilisierte Scheibe aus Kautschuk, die in der Mitte mit einem entsprechenden Loch versehen war. Diese Scheiben bildeten eine Decke, die das Herabfallen von Keimen verhinderte.

Nach erfolgter Beimpfung wurde nicht der Wattebausch wieder eingesetzt, sondern der Kolben statt dessen mittels eines im Autoklav sterilisierten Kautschukstöpsels verschlossen, der eine bis in die Mitte des Kolbens gehende dünne Glasröhre hatte. Die Röhre ragte außerhalb des Kolbens etwa 10 cm hervor und war durch einen kurzen Schlauch und Glasstöpsel verschlossen.

Die Erdekulturen wurden in ähnlicher Weise behandelt. In jeden Kolben kamen 20 g nicht ganz lufttrockene fein gesiebte Erde. Nach einer Sterilisierung im Autoklav bei 126° während ¾ bis 1 Stunde waren sie praktisch steril, d. h. man konnte sogar nach mehreren Wochen keine nennenswerte Kohlensäureproduktion feststellen, was für meine Zwecke ausreichte. Auch in Erde wuchs der von Kartoffelkulturen übertragene *Gibberella*-Stamm gut, obwohl natürlich nicht so luxurierend wie im Pepton. Der Boden muß nur eine angemessene Feuchtigkeit haben. Da bei dem Herstellen einer p_H-Reihe verschiedene Mengen der HCl-Lösungen gegeben werden müssen, also auch verschiedene Mengen Wasser, so war es notwendig, diese durch Hinzufügen von reinem Wasser zu kompensieren. Waren zur Herstellung einer p_H-Reihe z. B. HCl-Mengen (n/1) von 0 bis 2,0 ccm nötig, so wurde im ganzen immer 4 ccm Lösung gegeben. In den neutralen Kolben kamen also 4,0 ccm reines Wasser, in den stark sauren Kolben 2,0 ccm HCl + 2,0 ccm Wasser.

Die fertig angelegten Kulturen kamen in einen Thermostat bei 20° C.

Als Maß des Wachstums wurde, wie oben gesagt, die Kohlensäureproduktion genommen. Da die Fusarien sehr stark atmen und dabei sehr unempfindlich sind für Kohlensäure, auch in so hohen Konzentrationen wie

10 Proz. (*Lundegårdh*, 1923), so ließ ich einfach die Kohlensäure sich in dem Kulturkolben ansammeln. Nach Beendigung des Versuchs wurde die in dem Kolben herrschende Kohlensäurekonzentration mittels eines gasanalytischen Apparates bestimmt. Ich benutzte einen Apparat eigener Konstruktion, die eine Genauigkeit von ± 0,003 Proz. zuläßt, was für meine Zwecke mehr als hinreichend war. Die Ausfuhrröhre des Kolbens wurde nach Entfernung des Glasstöpsels einfach mit der Gasbürette in Verbindung gesetzt und eine Probe von 10 ccm Inhalt wurde eingesaugt. Da sämtliche Kolben ausgemessen waren, so konnte man aus der gefundenen Konzentration leicht die absolute Menge der produzierten Kohlensäure berechnen.

Durch die Atmungsbestimmung bekommt man einen Ausdruck für das Gedeihen der Pilze schon, wenn die Menge der gebildeten Trockensubstanz so gering ist, daß man sie überhaupt nicht durch Wägung zuverlässig bestimmen kann. Die Pilzernte war in meinen Versuchen selten höher als einige Zentigramm. Das Wägen einer solchen kleinen Menge bereitet große Schwierigkeiten, weil man genötigt ist, die ausgewaschenen Pilzflocken auf ein Filtrum aufzufangen und nach Trocknen samt dem Filtrum zu wägen. Letzteres muß also zuerst trocken gewogen werden und dann mit dem Pilz. Wegen der außerordentlich hohen Hygroskopizität des Pilzes und auch des Papieres bekommt man aber beim Wägen der vom Exsikkator kommenden Objekte kein konstantes Gewicht. Die Gewichtswerte so kleiner Ernten sind also nicht zuverlässig. Nur in einigen Versuchen (Tabelle VI und VII) ist das Ergebnis zum Vergleich als Gewicht angegeben.

Die Frage ist nun, ob Atmung und Wachstum parallel gehen. Bei Pilzen schwankt bekanntlich der sogenannte ökonomische Koeffizient, d. h. das Verhältnis zwischen gebildeter Trockensubstanzmenge und abgegebener Kohlensäuremenge ziemlich stark, wenn man verschiedene Nährmedien benutzt. *Pringsheim* (1914) hat gefunden, daß auch der Zusatz von Schwermetallionen, die das Wachstum reizen, eine Verschiebung des ökonomischen Koeffizienten mitbringen kann. Wie die Wasserstoffionen wirken, scheint nicht ausgemacht zu sein. Ich kenne hier nur die Arbeit von *F. G. Gustafsson* (1920), der angibt, daß in dem weiten Konzentrationsgebiet p_H 4 bis 8 die Atmung von Penicillium chrysogenum normal verläuft. Auch meine Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß die H-Ionen keine erheblichere Wirkung auf die *absolute* Atmungsintensität, also auf das Verhältnis Wachstum/Atmung ausüben. Übrigens handelt es sich für uns um ein vergleichendes Studium, wo wir als Reaktion die Vitalität des Pilzes studieren wollen, und für diese ist wohl die Atmung ein ebenso guter Ausdruck wie das Wachstum, auch wenn die beiden Vorgänge nicht vollkommen parallel gehen sollten.

Trotz der kurzen Versuchsdauer (immer 9 Tage) findet immer eine gewisse Regulation der p_H durch die Tätigkeit des Pilzes statt (vgl. die Tabellen). Die Intervalle wurden deshalb ziemlich groß gewählt. Für mich kam es nicht darauf an, die Gestalt der p_H-Kurve im Detail festzustellen.

Ergebnisse.

Die Resultate sind zusammengestellt in den Tabellen II bis VIII sowie in Abb. 1, und die Schilderung kann unter Hinweis auf dieselben kurz gefaßt werden. Trotz der recht starken Variation der Einzelergebnisse zeigen jedoch die Tabellen unzweideutig den großen Einfluß

gleichzeitig anwesender Salze auf die Widerstandsfähigkeit des Pilzes gegen höhere Wasserstoffionenkonzentrationen.

Das saure Kaliumphosphat wirkt schon in der fast neutralen Lösung stark begünstigend auf das Wachstum. Die Atmungsintensität hat durchschnittlich um etwa 50 Proz. zugenommen. Bei zunehmender p_H-Konzentration sinkt jedoch die Kurve rasch, obwohl das Phosphat, wie die Kontrollbestimmungen lehren, an sich kaum erhöhend auf die p_H-Konzentration wirkt. Die relative Wirkung des Phosphats geht aus folgender Zusammenstellung hervor:

p_H	6,8	6,0	4,7	3,3	2,7
Atmung in der Phosphatlösung im Vergleich zur Kontrolle . . .	147	144	131	115	75 Proz.

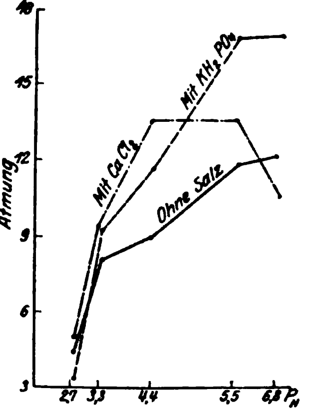


Abb. 1. Graphische Darstellung der Versuchsreihen 1, 3 und 4.

Wir sehen also, daß das saure Kaliumphosphat nicht die Wirkung der H-Ionen abstumpft, denn das relative Atmungsübergewicht sinkt immerfort und in der sehr sauren Lösung p_H 2,7 wird durch das Phosphat die Giftwirkung sogar verstärkt. Man kann die Sache nur so auffassen, daß das Phosphat an sich das Wachstum begünstigt, so daß die Erträge in den nicht allzu sauren Lösungen *absolut* genommen stärker ausfallen als ohne Phosphat.

Ganz anders verhält sich das Calciumchlorid. Ein Blick auf die Abb. 1 zeigt, daß die Calciumwirkung am Neutralpunkt sehr unsicher ist. Erst auf der entschieden sauren Seite erhebt sich die Kurve bedeutend über die Kontrollkurve. Eine Zusammenstellung der relativen Atmungswerte (wieder in Prozenten der Atmung der Kontrollen bei demselben p_H dargestellt) ergibt folgendes Ergebnis:

p_H	6,8	6,0	4,7	3,3	2,7
Atmung in der $CaCl_2$-Lösung im Vergleich zur Kontrolle . . .	86	116	153	117	110 Proz.

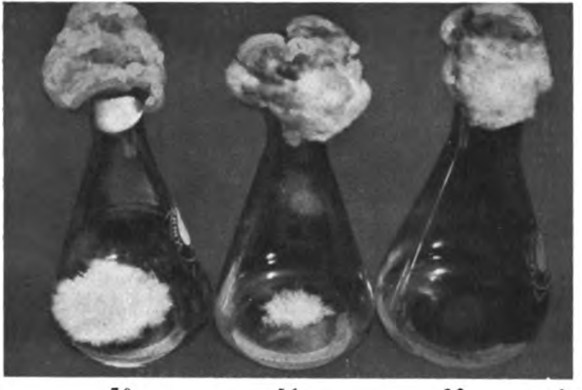
Die entgiftende Wirkung des Calciums äußert sich also darin, daß das Optimum der p_H-Kurve nach der sauren Seite hin verschoben wird. Seine stärkste Wirkung entwickelt das Calcium in dem obigen Falle bei p_H 4,7, also in einem ziemlich stark sauren Medium.

Es besteht also zwischen dem Calcium und dem Wasserstoff ein ähnlicher Ionenantagonismus, wie z. B. zwischen Calcium und Magnesium bei dem Wachstum höherer Pflanzen. Dieser letzterwähnte Antagonismus konnte von *Lipman* (1909) nicht bei dem Bakterium *Bacillus subtilis* aufgefunden werden. *Gibberella* verhält sich aber auch

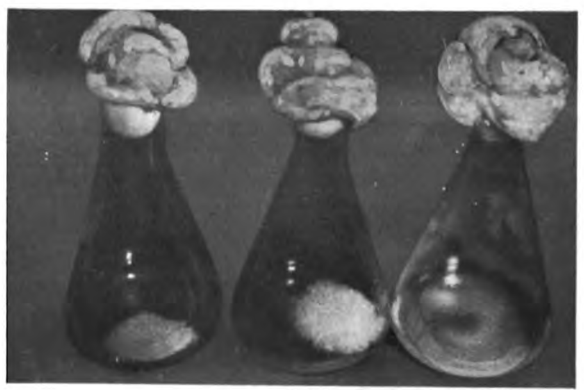
in dieser Beziehung den höheren Pflanzen analog, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

Tabelle I. Grundlösung: 20 ccm 2proz. Peptonlösung.

Zusatz	0,1	ccm	n/10 $MgCl_2$	Atmung	in	3	Tagen	0,320 mg
,,	0,5	,,	n/10 $MgCl_2$	,,	,,	3	,,	0,402 ,,
,,	0,1	,,	n/10 $CaCl_2$	,,	,,	3	,,	0,694 ,,
,,	0,5	,,	n/10 $CaCl_2$	,,	,,	3	,,	0,585 ,,
,,	0,1	,,	n/10 $MgCl_2$ }	,,	,,	3	,,	0,505 ,,
,,	0,1	,,	n/10 $CaCl_2$ }					
,,	0,5	,,	n/10 $MgCl_2$ }	,,	,,	3	,,	0,555 ,,
,,	0,5	,,	n/10 $CaCl_2$ }					



p_H 7,0 5,6 3,3 ohne Salz



p_H 7,1 5,8 3,7 + 1 ccm n/10 $CaCl_2$

Abb. 2. Photographische Aufnahme aus der fünften Versuchsreihe. Der Pilz wächst unter Beigabe von $CaCl_2$ auch in den sauren Lösungen gut.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ca-Ionen ist also die hemmende Wirkung von den Mg-Ionen deutlich abgemindert, obwohl das Wachstum

nicht völlig dasjenige in reiner $CaCl_2$-Lösung erreicht. An sich hat dagegen, wie vorhin gesagt, das Calciumion keine nennenswerte Wirkung auf das Wachstum in neutralen Lösungen. Das Wachstum ging in einer Lösung mit 1,0 ccm $CaCl_2$ etwa gleich schnell wie bei Zusatz von nur 0,1 ccm $CaCl_2$. Das Calcium ist also als Nährstoff entbehrlich, wie dies ja schon früher betreffs einiger Pilze festgestellt wurde.

In der Tabelle VIII sind einige Versuche in Erde wiedergegeben. Leider war es mir nicht möglich, diese Reihen zu wiederholen, da der Pilz zu dieser Zeit einging. Aus den Versuchen geht jedoch hervor, daß das saure K-Phosphat und das Calciumchlorid eine ähnliche Wirkung haben wie in den Peptonkulturen. Namentlich der Calciumversuch zeigt deutlich die entgiftende Wirkung in dem sauren Gebiet. Es dürfte also nach dem, was hier aufgezeigt wurde, keinem Zweifel unterliegen, daß das Calciumion auch in der Natur eine große Rolle für das Gedeihen der *Gibberella* spielt. Dieser Pilz ist bekanntlich ein Erreger der Wurzelkrankheit. Er lebt normal im Boden und infiziert von hier aus die keimenden Getreidekörner (s. *Lundegårdh*, 1923). Eine weitere Diskussion der praktisch wichtigen Frage, wie der Nährsalzgehalt des Bodens und namentlich sein Kalkgehalt auf das Auftreten der Krankheit wirke, soll hier unterbleiben, da vorerst natürlich die Einwirkung der hier geprüften Ionenmischungen auf das Gedeihen der Wirtspflanzen verfolgt werden muß.

Von anderen Ionen habe ich NH_4 und Al geprüft. Ein Zusatz von Ammoniumchlorid (Tabelle III) hat unzweifelhaft eine Entgiftung bei p_H 5,1 bis 5,5 hervorgerufen. Weil die Regulation der Wasserstoffionenkonzentration seitens des Pilzes in der Ammoniumchloridlösung stärker als in den Kontrollen und auch als in den anderen Lösungen war, sind die Ergebnisse nicht ganz vergleichbar. Doch findet man auch bei p_H 3,0 bis 3,5, wo die Regulation in beiden Fällen gleich stark war, eine deutlich stärkere Atmung. Höchstwahrscheinlich kommt auch dem Ammoniumion eine gewisse entgiftende Wirkung auf das H-Ion zu, obwohl nicht so ausgeprägt wie bei Calcium.

Auch Natrium wurde geprüft, zwar nur in einer Reihe, gab aber keine bemerkbare Wirkung. Entschieden giftig wirkt dagegen Aluminium in stärkerer p_H-Konzentration (Tabelle VII). In neutraler Lösung ist aber keine Giftwirkung zu beobachten. In diesem Falle scheint also eine direkte Verstärkung der Wirkung der H-Ionen vorzuliegen, die aber nicht darauf zurückgeführt werden kann, daß die Wasserstoffionenkonzentration durch Hinzufügen von Aluminiumchlorid steigt. Bei der benutzten Konzentration ist nämlich, wie aus den p_H-Werten in Tabelle VII ersichtlich, die Ansäuerung ganz unbedeutend.

Tabelle II. Erste Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. Kein Salz.

1. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,8	6,3	4,0	3,5	2,8
Atmung in mg	1,48	1,50	0,64	0,84	0,42
2. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,8	6,2	4,8	3,4	2,8
Atmung in mg	1,18	0,88	0,92	0,78	0,50
3. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,8	6,5	4,8	3,6	2,7
Atmung in mg	1,04	1,19	1,14	0,80	0,42
Mittel der drei Serien	**1,23**	**1,19**	**0,90**	**0,81**	**0,45**

Tabelle III. Zweite Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm 1proz. NH_4Cl-Lösung.

1. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,6	6,6	5,1	3,5	2,7
Atmung in mg	—	1,66	0,68	0,88	0,57
2. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	—	1,34	1,40	0,68	0,42
3. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	1,40	1,34	1,04	1,52	0,02
Mittel der drei Serien	—	**1,25**	**1,04**	**1,03**	**0,20**

Tabelle IV. Dritte Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm 1proz. KH_2PO_4-Lösung.

1. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,8	6,1	4,7	3,6	2,8
Atmung in mg	1,82	1,80	1,32	1,26	0,62
2. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	1,83	1,93	1,40	0,60	0,20
3. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	1,51	1,41	0,83	0,94	0,21
Mittel der drei Versuche	**1,72**	**1,71**	**1,18**	**0,93**	**0,34**

Tabelle V. Vierte Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm 1proz. $CaCl_2$-Lösung.

1. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
p_H am Ende	6,8	6,4	4,3	3,6	2,8
Atmung in mg	0,88	0,88	0,78	0,67	0,32
2. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	—	1,74	1,60	1,03	0,24
3. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	1,10	1,50	1,40	1,0	0,70
4. p_H am Anfang	6,8	5,5	4,0	3,0	2,7
Atmung in mg	1,20	1,40	1,72	1,18	0,75
Mittel der vier Versuche	**1,06**	**1,38**	**1,38**	**0,95**	**0,50**

Tabelle VI. Fünfte Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. Kein Zusatz.

1. p_H	7,8	7,0	5,6	3,3
Trockengewicht in g	0,10	0,08	0,058	0,00

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm n/10 $CaCl_2$-Lösung.

2. p_H	7,8	7,1	5,8	3,7
Trockengewicht in g	0,11	0,06	0,08	0,06

Tabelle VII. Sechste Reihe.

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. Kein Zusatz.

1. p_H am Ende	7,4	6,4	4,4	3,0
Trockengewicht in g	0,05	0,04	0,02	0,0

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm n/10 $MgCl_2$-Lösung.

2. p_H am Ende	7,3	6,4	4,4	3,4
Trockengewicht in g	0,05	0,06	0,04	0,0

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 1,0 ccm n/10 $MgCl_2$ + 1,0 ccm $CaCl_2$.

3. p_H am Ende	7,3	6,4	4,4	3,6	3.0
Trockengewicht in g	—	—	0,04	0,04	0,004

Grundlösung: 20 ccm 2proz. Pepton. 0,5 ccm n/10 $AlCl_3$-Lösung.

4. p_H am Ende	7,2	6,0	4,4	3,4
Trockengewicht in g	0,05	0,03	0,003	0,000

Tabelle VIII. Siebente Reihe.

Nährsubstrat: 20 g gesiebter Erde aus einem humusreichen Lehmboden (10 Proz. Humus).

p_H	6,5	5,6	4,3	3,0
1. ohne Zusatz	1,45	1,27	0,83	0,25
2. Mit 1,0 ccm 1proz. KH_2PO_4. Atmung in mg	2,03	1,33	0,94	0,18
3. Mit 1,0 ccm 1proz. $CaCl_2$. Atmung in mg	1,91	1,62	1,40	0,35

Literatur.

W. R. G. Atkins, Nature **103**, 80, 1921. — *W. Brenner*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1920. — *S. D. Conner* und *O. H. Sears*, Soil Science **13**, 23, 1922. — *I. A. Denison*, ebendaselbst **13**, 81, 1922. — *F. G. Gustafsson*, Journ. of general. Physiol. **2**, 617, 1920. — *C. G. Hopkins*, Amer. Journ. of Bot. **9**, 159, 1922. — *G. Joachimoglu*, diese Zeitschr. **134**, 489, 1923. — *A. Jodlbauer* und *F. Haffner*, Pflügers Arch. **179**, 134, 1920. — *Lipman*, Bot. Gazette 1909. — *H. Lundegårdh*, Botaniska Notiser. Lund 1923, S. 25. — *W. H. Mac Intire*, Journ. Amer. Soc. Agron. **13**, 137, 1921. — *E. G. Pringsheim*, Zeitschr. f. Bot. **6**, 577, 1914. — *J. M. Sherman* und *G. E. Holm*, Journ. of Bact. **7**, 465, 1922. — *Vl. Úlehla* und *Vl. Morávek*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1922, S. 8. — *R. W. Webb*, Ann. Missouri Garden **6**, 1919.

Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien.

II. Mitteilung:

Der Verwendungsstoffwechsel der Kaltblütertuberkelbazillen (Blindschleichentuberkelbazillus und Schildkrötentuberkelbazillus Friedmann).

Von

H. Braun, A. Stamatelakis, Seigo Kondo und R. Goldschmidt.

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des hygienischen Universitätsinstituts in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 28. Februar 1924.)

Nachdem wir, wie in der ersten Mitteilung[1]) berichtet wurde, den Verwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus und einiger anderer säurefester Saprophyten kennengelernt hatten, gingen wir dazu über, Kaltblütertuberkelbazillen zu untersuchen. In der Literatur finden sich Angaben über die Züchtung von Kaltblütertuberkelbazillen in künstlichen Nährböden besonders bei *Long*[2]). Seine Methodik unterscheidet sich von der unserigen (feste Nährböden, keine Passagen), und die Resultate stimmen nicht mit den unserigen immer überein. Unsere Methodik war dieselbe wie bei der Untersuchung der Saprophyten. Systematisch wurde von uns ein Blindschleichentuberkelbazillus und der Schildkrötentuberkelbazillus von *Friedmann* untersucht. Den Blindschleichentuberkelbazillenstamm verdanken wir Herrn Dr. *Bruno Lange* vom Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch", dem wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank sagen möchten. Den Schildkrötentuberkelbazillus züchteten wir uns aus dem *Friedmann*schen Impfstoff durch Plattenaussaat rein. Das Verhalten der Stämme bei der morphologischen und kulturellen Untersuchung auf den gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden und im Tierversuch war folgendes: Beide Kaltblütertuberkelbazillenstämme wuchsen bei der Temperatur von 22° gut. Wurden sie bei 37° bebrütet, so ließen sich Kulturen gewinnen. Die Form und Beschaffenheit der Kolonien war gegenüber den bei 22° gezüchteten verändert [*B. Lange*[3])].

Die Eigenschaften, die wir im folgenden beschreiben, beziehen sich, wenn nichts anderes vermerkt ist, auf Züchtungen bei 22°.

Zunächst wollen wir den *Blindschleichentuberkelbazillus* behandeln.

---

[1]) Diese Zeitschr. **145**, 381, 1924.
[2]) The Amer. Rev. of Tuberculosis **5**, 1922.
[3]) Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **93**, 1921.

Auf dem gewöhnlichen Nähragar bildete der Blindschleichentuberkelbazillus nach dreitägiger Bebrütung einen grauweißlichen feuchten Belag, der auch bei weiterer Bebrütung keine wesentlichen Veränderungen zeigte. In der gewöhnlichen Nährbouillon bildete sich bei mehrtägiger Bebrütung ein krümeliger Bodensatz, der aus mittellangen, schlanken, säurefesten und grampositiven Bakterien bestand. Manchmal trat in der Bouillon neben dem Bodensatz auch eine Trübung der Nährflüssigkeit ein. Immer fiel bei der morphologischen Untersuchung die Schlankheit der Bakterien auf. Ihre Länge wechselte zwar in den verschiedenen Nährböden, dagegen war die Schlankheit immer feststellbar. In der Glycerinbouillon bildete sich neben dem Bodensatz häufig auch ein zartes Häutchen, gelegentlich trat auch eine Trübung der Flüssigkeit ein. Ein besonders üppiger grauweißer feuchter Belag entwickelte sich bei mehrtägiger Bebrütung auf Löfflerserum. Farbstoffbildung und tryptische Verdauung haben wir auf diesem Nährboden niemals beobachtet. In der *Frieber*schen Trypsinbouillon entwickelte sich nach mehreren Tagen ein zartes Häutchen mit geringem Bodensatz, der bei weiterer Bebrütung zunahm. Auch eine schwache Trübung trat des öfteren ein. Indol war mit *Ehrlichs* Reagens nicht feststellbar. In Traubenzucker- und Milchzucker-hoher-Schicht konnte in der Tiefe keine Vermehrung oder Gasbildung beobachtet werden. Das Wachstum trat nur in der aeroben Zone auf. Die rotviolette Lackmusmolke wurde nach einigen Tagen blau und trübte sich schwach. Nach mehrtägiger Bebrütung entstand eine amethystblaue Färbung der Lackmusmolke ohne stärkere Trübung. In Gelatineschüttelkulturen bildete sich nach mehrtägiger Bebrütung an der Oberfläche eine grauweiße Trübung; eine Verflüssigung konnte nicht nachgewiesen werden. Auf Lackmus-Mannit-, auf Lackmus-Maltose- und Lackmus-Saccharoseagar wuchs der Blindschleichentuberkelbazillus in Form eines grauweißen Belags, ohne den Nährboden zu röten oder sonst irgendwie zu verändern. Auf Agarplatten, denen defibriniertes Kaninchenblut zugesetzt war, trat bei Beimpfung mit Blindschleichentuberkelbazillen keine Hämolyse auf. *Lipasen* gegenüber Rindertalg und Schweinefett, die in Emulsion dem Agar beigemischt wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Auch *Amylase* ließ sich trotz längerer Bebrütung der beimpften Stärkeagarplatten nicht nachweisen. Die Jodreaktion blieb immer neben den Impfstrichen positiv.

Was die Virulenz unseres Blindschleichentuberkelbazillus betrifft, so konnten wir an Kaltblütern leider keine Versuche anstellen. Wurden Meerschweinchen mit großen Mengen Bakterien, z. B. einer halben 14tägigen Kultur, die bei 22° auf Lubenaunährboden gezüchtet war, subkutan injiziert, so entwickelte sich nach mehreren Tagen eine Schwellung der zugehörigen Lymphdrüsen, die nach einigen Wochen nicht mehr nachweisbar war. Wurden die Tiere nach 3½ Monaten getötet, so zeigten sie in den inneren Organen keinerlei tuberkulöse Veränderungen. Bei intraperitonealer Injektion derselben Kulturmenge konnten am Meerschweinchen intra vitam keinerlei Krankheitserscheinungen festgestellt werden. Nach 3½ Monaten wurden die Tiere getötet. Bei der Sektion waren starke Verwachsungen der Milz und des großen Netzes feststellbar. Die Milz war nicht vergrößert, und es konnten in ihr mikroskopisch im Ausstrichpräparat keine Mikroorganismen festgestellt werden. In der Milz und auch an den übrigen inneren Organen wurden makroskopisch Knötchen nicht festgestellt.

Kaninchen, denen subkutan große Mengen (eine halbe Lubenaukultur) Blindschleichentuberkelbazillen injiziert wurden, zeigten nach einigen Tagen

eine Schwellung der zugehörigen Lymphdrüsen. Tiere, die nach 6 Wochen getötet wurden, zeigten eine Vergrößerung der regionären Lymphdrüsen, aber keinerlei tuberkulöse Veränderungen in den inneren Organen.

Das Verhalten des *Schildkrötentuberkelbazillus* war folgendes:

Auf dem gewöhnlichen Nähragar wuchs der Schildkrötentuberkelbazillus nach mehrtägiger Bebrütung in einem zarten grauweißen Rasen. In der Nährbouillon bildete er einen geringen feinflockigen Bodensatz und trübte sehr leicht die Nährflüssigkeit. Auf Löfflerserum bildete er nach längerer Bebrütung einen weißlichen schmierigen Belag. Erweichung oder Verflüssigung des Nährbodens wurde nicht beobachtet. Bei der morphologischen Untersuchung war der Schildkrötentuberkelbazillus stets außerordentlich schlank. Die Säurefestigkeit war mit großer Regelmäßigkeit feststellbar. Bei der Gramfärbung waren die Stäbchen dunkelblau und wiesen des öfteren zahlreiche Körner im Leibe auf. In der Trypsinbouillon wuchs er im feinflockigen Bodensatz. Die Nährflüssigkeit selbst blieb meist klar. Indol war nicht feststellbar. Die *Petruschky*sche Lackmusmolke trübte sich leicht, war zunächst violett, später blau. In der traubenzuckerhohen Schicht war nach mehrtägiger Bebrütung Wachstum an der Oberfläche und in der aeroben Zone feststellbar. Gasbildung trat nie ein. Ganz genau so verhielt sich dieser Mikroorganismus in milchzuckerhoher Schicht. Auf Mannit-, Maltose-, Saccharose - Lackmusagar entwickelte sich ein zarter Rasen. Der Nährboden blieb unverändert blau. In der Gelatineschüttelkultur trat nur in der aeroben Zone Wachstum ein. Verflüssigung wurde nach mehrtägiger Bebrütung nicht beobachtet. Wurden Agarplatten, die gewaschene rote Blutkörperchen des Kaninchens enthielten, mit Schildkrötentuberkelbazillen beimpft, so trat auch nach siebentägiger Bebrütung und gutem Wachstum keine Hämolyse ein. *Lipasen* gegen Rindertalg, Schweinefett und Olivenöl wurden auf Agarplatten, denen diese Fette in Emulsion zugesetzt waren, nicht nachgewiesen. Auch *Amylase* konnte nicht festgestellt werden.

Was die Virulenz unseres Schildkrötentuberkelbazillus betrifft, so wurden Kaninchen und Meerschweinchen infiziert. Beide Tierarten vertrugen bei subkutaner Injektion große Mengen der Bakterien (eine halbe Glycerinagarkultur, 14tägig bei 22°). Nach der Injektion in die Schenkelbeuge entwickelte sich meistens eine Schwellung der regionären Lymphdrüsen. Nach 6 Wochen getötet, zeigten die Tiere keinerlei tuberkulöse Veränderungen in den inneren Organen.

Der Verwendungsstoffwechsel des Blindschleichen- und des Schildkrötentuberkelbazillus.

Bevor wir auf die Besprechung der Verwertbarkeit der verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durch den Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus eingehen, möchten wir einige Vorbemerkungen machen. Bei den säurefesten Saprophyten haben wir eine außerordentliche Anspruchslosigkeit kennengelernt, die darin besteht, daß diese Mikroorganismen bei im Nährboden fehlender Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle oder sogar bei Abwesenheit beider bei reichlichem Zutritt der Brutschrankluft zu gedeihen vermögen, indem sie offenbar die geringen Mengen kohlenstoff- und stickstoffhaltiger Substanzen in dieser ausnutzen. Dieser Umstand hat deshalb die

Prüfung des Verwendungsstoffwechsels der Syprophyten nicht vereitelt, weil das Wachstum unter solchen Bedingungen nur ein außerordentlich langsames und kümmerliches ist. Immerhin stellt diese Tatsache eine Fehlerquelle bei der Bewertung der Nährstoffe dar und erfordert eine besondere Berücksichtigung.

Wir haben deshalb analoge Versuche, wie wir sie beim Timotheebazillus ausführlich besprochen haben, auch mit dem Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus ausgeführt. In einer Nährlösung, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,5 g Ammoniumsulfat, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,2 g Phosphatgemisch (1 Teil primäres, 3 Teile sekundäres Kaliumphosphat) enthielt, der also eine Kohlenstoffquelle fehlte, konnte sich der Blindschleichentuberkelbazillus bei zweimonatiger Beobachtung *nicht* vermehren. Ebenso verhielt sich der Schildkrötentuberkelbazillus. In einer Nährlösung, der außerdem noch die Ammoniakquelle fehlte, wuchsen sie natürlich ebenfalls nicht. Die Nährlösung enthielt in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 0,5 g NaCl, 0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g Magnesiumsulfat.

Was nun die stickstofffreie, aber kohlenstoffhaltige Nährlösung betrifft, so zeigten die Versuche, daß der Blindschleichentuberkelbazillus in einem solchen Nährboden beim reichlichen Zutritt der Brutschrankluft in der Tat, wenn auch *sehr kümmerlich und langsam,* gedeihen konnte. Die Nährlösung enthielt in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 0,5 g NaCl, 0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,5 g Natriumacetat, p_H 7,1. In diesem Nährboden wuchs der Blindschleichentuberkelbazillus z. B. in einem Versuch innerhalb der Zeit vom 13. April bis 6. September 1923 in fünf Passagen.

Der Schildkrötentuberkelbazillus verhielt sich ähnlich. Er konnte in diesem Nährboden, wenn auch langsam und meist kümmerlich, in Passagen gedeihen. So wuchs er z. B. in einem Versuch vom 13. April bis 20. September 1923 in fünf Passagen. Es zeigten also die Versuche, daß die kohlenstoffhaltigen Substanzen der Atmosphäre, die den Saprophyten genügten, den Kaltblütertuberkelbazillen nicht ausreichten, daß aber diese Mikroorganismen mit den stickstoffhaltigen Substanzen der Brutschrankluft als Stickstoffquelle mühsam auskamen.

A. Verwertung der Kohlenstoffquellen.

Bei der Untersuchung der Kohlenstoffquellen gingen wir von einer Stammlösung aus, die in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 1 g NaCl, 1 g Ammoniumsulfat, 0,01 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Phosphatgemisch enthielt. Sie reagierte auf Lackmus schwach alkalisch, p_H nach *Michaelis* bestimmt betrug 7,1. Zu Anfang unserer Versuche benutzten wir statt des Phosphatgemisches 0,4 g Kaliumbiphosphat und neutralisierten die Stammlösung mit n-Sodalösung. 1proz. Lösungen der verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden zu gleichen Teilen mit der Stammlösung zusammengemischt, so daß der Prozentgehalt der fertigen Nährlösung an den verschiedenen

Substanzen auf die Hälfte der Stammlösungen gesunken ist. Jede Nährlösung wurde vor der Benutzung auf Reaktion geprüft und, wenn nötig, mit n-Sodalösung neutralisiert und auf p_H 7,1 gebracht. Die Nährflüssigkeiten wurden vor dem Gebrauch im Dampf sterilisiert. Die Methodik findet sich in der ersten Mitteilung in dieser Zeitschrift eingehend besprochen. Um Wiederholungen zu vermeiden, dürfen wir wohl auf diese hinweisen. Es mag nur nochmals daran erinnert werden, daß die verwendeten kohlenstoffhaltigen Substanzen stets die *einzige* Kohlenstoff- und Energiequelle waren, und daß die Züchtungen, wenn nichts anderes vermerkt, bei 22° ausgeführt wurden. Bemerken möchten wir noch, daß die zur Neutralisierung nötige Menge von Sodalösung als Kohlenstoffquelle *nicht* in Betracht kommt. Wie die Ergebnisse, über die im folgenden berichtet wird, zeigen, werden manche Kohlenstoffquellen, wie Mannit, Maltose, Saccharose von den Kaltblütertuberkelbazillen nicht verwertet. Ein Wachstum trat in solchen Nährböden trotz Anwesenheit der Sodalösung *nicht* ein, die in diesen Versuchen zur Neutralisation und zum Alkalisieren in größerer Menge verwendet werden mußte, da die hier benutzte Stammlösung nur Kaliumbiphosphat, nicht Phosphatgemisch enthielt.

a) Verwertung der organischen Säuren.

Als einfachste Kohlenstoffquelle wurde *Ameisensäure* geprüft. Als ameisensaures Natrium in ½proz. Konzentration wurde sie vom Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus nicht verwertet.

Dagegen erwies sich die *Essigsäure* als eine ausgezeichnete Kohlenstoffquelle für den Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus. Als Natriumacetat in ½proz. Konzentration wurde sie von diesen Mikroorganismen sehr gut ausgenutzt. Das Wachstum trat relativ schnell ein, und Passagen ließen sich ohne Schwierigkeiten durchführen. So konnten z. B. vom Blindschleichentuberkelbazillus vom 30. September bis 19. November, also in 1½ Monaten, fünf Passagen erzielt werden. Es entwickelte sich ein zartes, weißliches Häutchen, das aus langen, schlanken, säurefesten Stäbchen bestand.

Auch die Natriumsalze der *Propionsäure* und *Buttersäure*, in 0,5proz. Konzentration, erwiesen sich bei beiden Kaltblütertuberkelbazillen als brauchbare Kohlenstoffquellen. Das gilt auch, wie nachträglich mitgeteilt sei, für den Timotheebazillus.

Was die *Oxalsäure* betrifft, die wir als oxalsaures Ammonium in ½proz. Konzentration geprüft haben, so vermochte sich der Blindschleichentuberkelbazillus auch bei zweimonatiger Beobachtung in diesem Nährboden nicht zu vermehren. Ganz das gleiche gilt vom Schildkrötentuberkelbazillus.

Das *milchsaure Natrium*, das dem Timotheebazillus als eine gute Kohlenstoffquelle diente, wurde in *wiederholten* Versuchen vom Blindschleichentuberkelbazillus *nicht* verwertet; nur einmal gelang es uns, ihn in mehreren Passagen mit milchsaurem Natrium als Kohlenstoffquelle zu züchten. Das Wachstum war in diesem Versuche nur ein sehr kümmerliches und außerordentlich langsames. Vom 16. November 1922 bis 9. März 1923, also in 4½ Monaten, ließ er sich in dieser Nährflüssigkeit in fünf Passagen fortzüchten. Beim Schildkrötentuberkelbazillus gelang es in wiederholten Versuchen nicht, ihn in Passagen zu züchten. Meist gingen die Kulturen nur bei der ersten Beimpfung sehr kümmerlich an, waren aber nicht fortzüchtbar.

Die *Bernsteinsäure* und die *Äpfelsäure* als Natriumsalz wurden vom Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus als Kohlenstoffquellen benutzt. Das Wachstum ließ gelegentlich längere Zeit auf sich warten.

doch war bei genügend langer Beobachtung eine zufriedenstellende Vermehrung feststellbar, und die Stäbchen waren säurefest.

Was die *Weinsäure* betrifft, die wir als weinsaures Natrium benutzt haben, so ließ sich darin der Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus nicht züchten.

Die *dreibasische Citronensäure* wurde von diesen Mikroorganismen als einzige Kohlenstoffquelle verwertet. Es gelang z. B. in einem Versuche, sie innerhalb von 3 Monaten fünf Passagen hindurch zu züchten. Das Wachstum war, wenn auch nicht immer, ein gutes.

b) Verwertung von Alkoholen.

Beim Arbeiten mit flüchtigen Alkoholen wurden die Wattestopfen der Kölbchen paraffiniert, um die Verflüchtigung zu verhindern. Durch Kontrollversuche an gut verwertbaren Kohlenstoffquellen, z. B. Acetat, überzeugten wir uns davon, daß die im Kölbchen eingeschlossene Sauerstoffmenge den Kaltblütertuberkelbazillen zum Wachstum genügte.

Was den *Methylalkohol* betrifft, so gelang die Züchtung der Kaltblütertuberkelbazillen in wiederholten Versuchen nicht. Wir möchten bei dieser Gelegenheit bemerken, *daß wir stets* alle *Versuche, in denen die Züchtung nicht gelang, einige Male, mindestens dreimal, wiederholten, um nach Möglichkeit Zufälligkeiten auszuschließen.* Vor allem muß man stets aus gut gewachsenen *nährstoffarmen* Nährböden die Abimpfungen vornehmen, z. B. aus Acetat-Ammoniak-Nährböden, weil in diesen bereits eine Auswahl der anspruchsloseren Keime stattgefunden hat, während beim Abimpfen von Glycerinbouillon oder einem anderen nährstoffreichen Nährboden erst eine Anpassung an die außerordentlich primitiven Ernährungsverhältnisse stattfinden muß. So kommt es des öfteren vor, daß beim Abimpfen von Glycerinagar das Wachstum in einem nährstoffarmen Nährboden ausbleibt, während die Kultur von Acetat-Ammoniaknährboden gelingt. Stets müssen mindestens zwei Kölbchen mit gleicher Nährflüssigkeit beimpft werden.

Während der Timotheebazillus und andere Saprophyten mit *Äthylalkohol* ein gutes Wachstum zeigten, vermochte ihn der Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus nicht als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu benutzen. Stets blieb das Wachstum aus. Darin unterscheiden sich also diese Kaltblütertuberkelbazillen von den säurefesten Saprophyten. Auch ein von uns untersuchter Froschtuberkelbazillus verhielt sich so wie die Blindschleichentuberkelbazillen. Die Prüfung auf die Alkoholassimilation ist demnach imstande, als differentialdiagnostisches Mittel zu dienen. Natürlich müssen, wenn ein Wachstum eintritt, stets Passagen ausgeführt werden, aus Gründen, die früher schon ausführlich besprochen worden sind.

Amylalkohol wurde von den Kaltblütertuberkelbazillen nicht verwertet.

Dagegen erwies sich das *Glycerin* beim Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus als eine vorzügliche Kohlenstoff- und Energiequelle.

Mannit als einzige Kohlenstoffquelle in 0,5proz. Konzentration wurde von ihnen nicht assimiliert.

c. Kohlehydrate.

Traubenzucker als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurde von den Kaltblütertuberkelbazillen verwertet. Das Wachstum war manchmal ein geringes, ein andermal aber ein gutes. Die Stäbchen waren stets säurefest.

Lactose, Maltose und *Saccharose*, deren Lösungen nicht durch Erhitzen, sondern durch Filtration keimfrei gemacht worden sind, wurden vom Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus *nicht* assimiliert.

B. Verwertung von Stickstoffquellen.

1. *Ammoniak.*

Wie bereits aus den berichteten Versuchen hervorgeht, ist *Ammoniak* für den Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus eine gute Stickstoffquelle, was auch schon frühere Autoren, z. B. *Long*[1]), nachgewiesen hatten.

2. *Nitrat.*

Auch *Nitrat* wird als Stickstoffquelle verwertet. Selbst bei Anwesenheit einfacher Kohlenstoffverbindungen als einzige Kohlenstoff- und Energiequellen, wie Acetat oder Glycerin, besonders aber dann, wenn diese *beiden* Stoffe gleichzeitig anwesend sind, vermögen der Blindschleichen- und der Schildkrötentuberkelbazillus die schwierige Aufgabe der Stickstoffgewinnung aus Nitrat zu vollbringen. Sie wachsen ziemlich schnell und üppig auf einem Nährboden, der außer den nötigen Mineralbestandteilen Kalium- oder Natriumnitrat in ½proz. Konzentration als einzige Stickstoffquelle enthält.

3. *Aminosäuren.*

Bei der Prüfung der *Aminosäuren* gingen wir so vor, daß wir sie in einer Versuchsreihe als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, in einer zweiten Versuchsreihe nur als Stickstoffquelle den Bakterien dargeboten hatten. In den zuletzt erwähnten Versuchen fügten wir Natriumacetat als zweite Kohlenstoffquelle hinzu. Es wurden folgende Aminosäuren geprüft: Glykokoll, d-Alanin, asparaginsaures Natrium, l-Leucin und l-Tyrosin. Der Nährboden enthielt in 100 ccm doppelt destillierten Wassers folgende Stoffe: 0,5 g NaCl, 0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g $MgSO_4$ und 0,5 g Aminosäure (bei l-Tyrosin 0,05 g).

Glykokoll, asparaginsaures Natrium, Asparagin und *Tyrosin* als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle konnten die geprüften Kaltblütertuberkelbazillen nicht assimilieren. In den ersten Kulturen konnte zwar manchmal ein geringes Wachstum festgestellt werden, doch ließen sich Passagen nicht durchführen. Dagegen vermochten diese Mikroorganismen mit *Alanin* und *glutaminsaurem* Natrium als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zu gedeihen. Das l-Leucin wurde von den Kaltblütertuberkelbazillen als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle mühsam verwertet. Es dauerte meist längere Zeit, bevor die Kulturen angingen, und das Wachstum war ein geringes.

Es mag daran erinnert werden, daß die Kaltblütertuberkelbazillen die stickstoffhaltigen Substanzen der Brutschrankluft mühsam verwerten können.

Die oben angeführten nicht unmittelbar verwertbaren Aminosäuren, Glykokoll und asparaginsaures Natrium, wurden von den Kaltblütertuberkelbazillen gut assimiliert, sobald Natriumacetat als zweite Kohlenstoffquelle anwesend war. Auch *Tyrosin* konnte, wenn auch recht mühsam, verwertet werden, wenn Natriumacetat zugegen war. Um diese Aminosäuren angreifen zu können, bedürfen also der Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus einer leicht angreifbaren Energiequelle. Dies wurde auch von *Long*[1]) festgestellt. Dadurch unterscheiden sie sich von dem Timotheebazillus, der diese Aminosäuren direkt angreift und assimiliert. Die Kaltblütertuberkelbazillen sind in dieser Hinsicht anspruchsvoller als der Timotheebazillus.

---

[1]) The Amer. Rev. of Tuberculosis 5, 1922.

C. Mineralstoffwechsel.

In der vorigen Mitteilung[1]) über den Verwendungsstoffwechsel der säurefesten Saprophyten haben wir hervorgehoben, daß sich diese Mikroorganismen gegenüber den Bakterien der Typhus-Koli-Gruppe dadurch unterscheiden, daß sie in bezug auf den Mineralstoffwechsel anspruchsvoller sind, indem sie außer Phosphorsalzen Magnesiumsulfat zum üppigen Wachstum benötigen. Versuche, die wir mit dem Blindschleichen- und Schildkrötentuberkelbazillus ausgeführt haben, zeigten, daß auch hier das Magnesiumsulfat unter den von uns gewählten Bedingungen das Wachstum begünstigt. In einem Nährboden, der in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 0,5 g NaCl, 0,6 g Ammoniumacetat, 0,2 g sekundäres Kaliumphosphat enthielt und mit Sodalösung neutralisiert und alkalisiert war, konnte der Blindschleichentuberkelbazillus in Passagen gedeihen. So konnten in diesem Nährboden z. B. in einem Versuche innerhalb von 4½ Monaten fünf kümmerliche Passagenkulturen vom Blindschleichentuberkelbazillus gewonnen werden. Setzte man dem Nährboden noch 0,005 g Magnesiumsulfat hinzu, so ließen sich ohne Schwierigkeiten in 2 Monaten fünf gut gewachsene Passagen gewinnen.

Der Schildkrötentuberkelbazillus wuchs in dem oben angegebenen magnesiumsulfatfreien Nährboden nicht in Passagen, ließ sich dagegen im magnesiumsulfathaltigen Nährboden ohne Schwierigkeiten gut fortzüchten.

Im kalifreien Nährboden, der in 100 ccm destillierten Wassers 0,5 g NaCl, 0,5 g Ammoniumsulfat, 0,2 g primäres Natriumphosphat, 0,005 g $MgSO_4$ enthielt und mit Sodalösung neutralisiert und bis p_H 7,1 alkalisiert wurde, ließ sich sowohl der Blindschleichen- wie auch der Schildkrötentuberkelbazillus in Passagen fortzüchten. Wir müssen auch hier wie bei der Besprechung solcher Versuche beim Timotheebazillus die Einschränkung machen, daß wir die Anwesenheit von Kaliumspuren nicht ausschließen können, weil wir zu unseren Zuchten gewöhnliche Glasgefäße benutzen mußten. Sicher ist, daß die Kaltblütertuberkelbazillen höchstens mit Spuren von Kali auskommen.

Wir werden auf den Mineralstoffwechsel der Kaltblütertuberkelbazillen in einer späteren Mitteilung noch zu sprechen kommen.

Überblicken wir den Verwendungsstoffwechsel der Kaltblütertuberkelbazillen und vergleichen ihn mit dem der säurefesten Saprophyten, so ergibt sich, daß *die Kaltblütertuberkelbazillen einen engeren Verwendungsstoffwechsel als die Saprophyten besitzen, da sie nicht alle Stoffe, die diese zu assimilieren imstande sind, unmittelbar angreifen können*. Die folgenden Tabellen I und II geben eine Übersicht über den Kohlenstoff- und Stickstoffverwendungsstoffwechsel der Kaltblütertuberkelbazillen.

In den folgenden Mitteilungen werden wir den Verwendungsstoffwechsel der Warmblütertuberkelbazillen behandeln und wollen in der nächsten Veröffentlichung über die Nahrungsbedürfnisse des Hühnertuberkelbazillus berichten.

---

[1]) Diese Zeitschr. **145**, 381, 1924.

Tabelle I. Die Assimilierbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen durch den Blindschleichentuberkelbazillus und den Schildkrötentuberkelbazillus Friedmann.
Zum Vergleich ist der Kohlenstoffverwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus beigefügt.

Kohlenstoffquelle:	Ameisensäure	Essigsäure	Propionsäure	Buttersäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure
Stickstoffquelle:	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3
Blindschleichen- und Schildkröten-tuberkelbazillus	○	+	+	+	○	*Bl.* ○? *Fr.* ○	+	+	○	+
Timotheebazillus . . .	○	+	+	+	schwach +	+	+	+	schwach +	+ ?

Kohlenstoffquelle:	Methylalkohol	Äthylalkohol	Amylalkohol	Glycerin	Mannit	Traubenzucker	Lactose	Maltose	Saccharose
Stickstoffquelle:	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3	NH_3
Blindschleichen- und Schildkröten-tuberkelbazillus . .	○	○	○	+	○	+	○	○	○
Timotheebazillus . .	○	+	○	+	+	+	○	○	○

Zeichenerklärung: + bedeutet Wachstum in Passagen; ○ bedeutet kein Wachstum; + ? bedeutet kümmerliches Wachstum in den ersten Passagen, aber nicht dauernd fortzüchtbar; ○? meist nicht gewachsen, nur gelegentlich sehr kümmerlich.

Tabelle II. Assimilierbarkeit verschiedener Stickstoffquellen durch den Blindschleichentuberkelbazillus und den Schildkrötentuberkelbazillus Friedmann.
Zum Vergleich ist der Stickstoffverwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus beigefügt.

Kohlenstoffquelle:	Acetat	Acetat	Glykokoll	d-Alanin	Asparaginsäure	Asparagin	l-Leucin	Glutaminsäure	l-Tyrosin	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat
Stickstoffquelle:	NH_3	Nitrat	Glykokoll	d-Alanin	Asparaginsäure	Asparagin	l-Leucin	Glutaminsäure	l-Tyrosin	Glykokoll	Asparaginsäure	l-Leucin	Tyrosin
Blindschleichen- und Schildkröten-tuberkelbazillus . .	+	+	○?	+	○?	○?	schwach +	+	○?	+	+	+	schwach +
Timotheebazillus . .	+	+	schwach +	+	+	+	+	+	schwach +				

Zeichenerklärung wie Tabelle I.

Über tierische Carboxylase.

Von

A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 15. Februar 1924.)

In früheren Mitteilungen haben *Neuberg* und *Gottschalk*[1]) gezeigt, daß im intermediären Stoffwechsel überlebender Warmblüterzellen (Leber- und Muskelbrei) Acetaldehyd in quantitativ bestimmbarer Menge auftritt und auf Kohlenhydrate als Muttersubstanzen zu beziehen ist. Die Methode, die diesen Einblick in die Abbauvorgänge tierischer Zellen gestattete, war die gleiche, mit der *Neuberg*[2]) früher die Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung ermittelt und messend verfolgt hatte: die Festlegung der Durchgangsstufe Acetaldehyd mit Hilfe von sekundären schwefligsauren Salzen. War durch obigen Befund auch eine weitere Parallele zwischen den kohlenhydratspaltenden Vorgängen in pflanzlichen und tierischen Organismen gezogen, so blieb doch weiterhin zu eruieren, ob der Mechanismus der Acetaldehydentstehung in animalischen Geweben der gleiche ist wie bei den unter anaeroben Verhältnissen tätigen Pilzen und Bakterien.

Durch die Untersuchungen *Neubergs* und seiner Mitarbeiter war mit Sicherheit festgestellt, daß Brenztraubensäure durch das als „Carboxylase" bezeichnete Ferment lebender Hefen sowie des Mazerationssaftes leicht in Acetaldehyd und Kohlendioxyd gespalten wird. Dabei sind die Ausbeuten an Acetaldehyd, wenn man die Vergärung der Brenztraubensäure in Gegenwart von Sulfit ablaufen läßt, nahezu die theoretischen[3]). Im Hinblick auf diese Befunde mußte auch für Leber- und Muskelzellen in erster Linie an Brenztraubensäure als die unmittelbare Vorstufe des nachgewiesenen Acetaldehyds gedacht werden, und das um so mehr, als bereits eine Reihe von Beobachtungen

---

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, Klin. Wochenschr. **1923**, Nr. 31; diese Zeitschr. **146**, 164 u. 185, 1924.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **106**, 281, 1920; *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, ebendaselbst **96**, 133, 1919.

[3]) *C. Neuberg* und *A. v. May*, ebendaselbst **140**, 299, 1923.

vorliegen, die für die Decarboxylierung dieser und anderer *a*-Ketocarbonsäuren durch tierische Gewebe sprechen.

So hat schon *Tschernorutzky*[1]) im Jahre 1912 angegeben, daß Muskel- und Leberbrei von Hund und Kaninchen unter antiseptischen Bedingungen ein beträchtliches Zerstörungsvermögen für Brenztraubensäure und ihr Natriumsalz besitzen, und *Maeda*[2]) hat kürzlich für menschliche Placenta das gleiche erwiesen. *P. Mayer*[3]) zeigte, daß bei der Digestion von Leberbrei (Schwein und Hund) mit phosphatgepufferter Oxalessigsäurelösung eine vollständige Ketonspaltung stattfindet, indem so viel Kohlensäure frei wird, als dem quantitativen Übergange in Brenztraubensäure entspricht. Diese Decarboxylierung der Oxalessigsäure durch tierische Zellen war nicht an die Zufuhr von Sauerstoff geknüpft. Sodann haben *B.* und *H. v. Euler*[4]) und in allerjüngster Zeit, wie mir bei der Korrektur bekannt wird, *Wieland* und *Rau*[5]) den Befund *Tschernorutzkys* bestätigt. Die genannten Autoren beobachteten bei dem Zusammentreffen von Organbrei und brenztraubensaurem Natrium eine Kohlensäureentwicklung, die *B.* und *H. v. Euler* jedoch bei ihrer Versuchsanordnung zum Teil der Zersetzung des Pyruvinates durch Bakterien zuschreiben.

Bei der großen Wandlungsfähigkeit der Brenztraubensäure in animalischen Zellen[6]), die ja das Arbeiten mit ihr im Tierversuch so außerordentlich erschwert und quantitative Beziehungen zwischen der Ketosäure und ermittelten Spaltungsprodukten bislang nicht mit der wünschenswerten Genauigkeit klarlegen ließ, sowie im Hinblick auf die Vieldeutigkeit des Entstehungsmechanismus von Kohlendioxyd in Gewebebrei, ist es erforderlich, den carboxylatischen Abbau der Brenztraubensäure durch die Festlegung von Acetaldehyd zu kennzeichnen. Für die Zellen tierischer Organe sind diesbezügliche Angaben bisher nicht vorhanden.

Auf Blutflüssigkeit haben *Stepp* und *Behrens*[7]) die Form des *Neuberg*schen Abfangverfahrens übertragen, bei der man sich des sekundären schwefligsauren Natriums bedient. Die angewandten Mengenverhältnisse von Brenztraubensäure und Dinatriumsulfit sind jedoch nicht glücklich gewählt gewesen.

In ihrer Mitteilung geben die Verfasser an, daß sie 2 ccm n Brenztraubensäure mit 5 ccm n/10 Dinatriumsulfit versetzt haben, „was einen Überschuß von mehr als das Doppelte bedeutet, da 1 Mol. Brenztraubensäure 1 Mol. Acetaldehyd liefert und dieser zur Bindung 1 Mol. Sulfit benötigt“. Hier waltet wohl ein stöchiometrisches Versehen ob; denn

[1]) *M. Tschernorutzky*, diese Zeitschr. **43**, 486, 1912.
[2]) *K. Maeda*, ebendaselbst **143**, 347, 1923.
[3]) *P. Mayer*, ebendaselbst **62**, 462, 1914.
[4]) *B.* und *H. v. Euler*, H. **97**, 311, 1916.
[5]) *H. Wieland* und *H. Rau*, Ann. **436**, 235, 1924.
[6]) Vgl. hierzu die Arbeiten von *P. Mayer*, diese Zeitschr. **40**, 441, 1912; **49**, 486, 1913; *P. Neukirch* und *P. Rona*, Pflügers Arch. **148**, 285, 1912; *G. Embden* und *E. Schmitz*, diese Zeitschr. **38**, 393, 1912; *G. Embden* und *M. Oppenheimer*, ebendaselbst **45**, 186, 1912.
[7]) *W. Stepp* und *B. Behrens*, H. **127**, 80, 1923.

2 ccm n Brenztraubensäure sind 20 ccm n/10 Na_2SO_3 äquivalent. Die Autoren haben aber nur ein Viertel davon benutzt, so daß die Lösung einen großen Überschuß an freier Brenztraubensäure enthielt, deren Stärke bekanntlich an die der Mineralsäuren herankommt und mehr als ausreicht, Sulfit zu zersetzen und den Übergang von freier SO_2 ins Destillat ihrer Ansätze zu bewirken. Aber selbst wenn die Autoren richtige stöchiometrische Verhältnisse zwischen Brenztraubensäure und Dinatriumsulfit gewählt hätten, müßten sie bei ihrer Arbeitsweise (l. c., S. 85 u. 87) stets schweflige Säure in den Destillaten finden, da sie einem entscheidenden Punkte keine Beachtung geschenkt haben. Bei der Reaktion zwischen Brenztraubensäure, Dinatriumsulfit und Bariumchlorid, die bei der analytischen Aufarbeitung eine Rolle spielt, kann kein $BaSO_3$ auftreten, da Brenztraubensäure einen sehr festen Sulfitkomplex und dieser ein lösliches und beständiges Bariumsalz

$$\left(CH_3.C(OH)<{}^{COO}_{O.SO_2}>Ba\right)$$

gibt. Wenn man aber eine Lösung desselben nun destilliert, so bildet sich Bariumsulfit und Brenztraubensäure; aus diesem Bariumsulfit setzt die Brenztraubensäure in der Hitze nach einem Gleichgewicht SO_2 in Freiheit:

$$CH_3.C(OH)<{}^{COO}_{O.SO_2}>Ba \rightleftarrows CH_3.CO.COOH + BaSO_3,$$

$$2CH_3.CO.COOH + 2BaSO_3 \rightleftarrows (CH_3.CO.COO)_2Ba + Ba(HSO_3)_2,$$

$$Ba(HSO_3)_2 \rightleftarrows BaSO_3 + H_2O + SO_2.$$

Die Autoren übersahen, daß nach der von *Neuberg* und Mitarbeitern befolgten Methode dieser Fehler nicht begangen wird; denn wenn man das Abfangverfahren bei *Zucker* anwendet, so entsteht nach der bewiesenen Gleichung

$$C_6H_{12}O_6 + Na_2SO_3 + H_2O = CH_3.CHOH.OSO_2Na + C_3H_8O_3 + NaHCO_3$$

Natriumbicarbonat, und es ist überhaupt keine Säure zugegen, welche aus schwefligsaurem Salz SO_2 austreiben könnte. Bei den Versuchen mit *Brenztraubensäure* ist, wie angegeben[1]), vor der Destillation Zusatz von Carbonaten erforderlich. Ferner sind lediglich aus neutraler (bzw. bicarbonat-alkalischer) Lösung die Sulfite mit Bariumchlorid fällbar, nicht dagegen aus saurer. Es ist also ausgeschlossen, mit Bariumchlorid aus einer nicht neutralisierten Lösung Sulfitionen auszufällen. Schon die von *Stepp* und *Behrens* angegebenen Eigenschaften ihres angeblichen Bariumsulfit-Niederschlages weisen darauf hin, daß sie kein Bariumsulfit in Händen gehabt haben dürften, eher vielleicht beigemengtes Bariumsulfat; denn Bariumsulfit filtriert besonders glatt und reißt anhaftendes Bariumsulfat so gut mit, daß man selbst mit gewöhnlichen Filtern ohne weiteres blanke Flüssigkeiten erhält. An diesen Überlegungen wird nichts geändert durch den Umstand, daß durch eine carboxylatische Wirkung die Acidität des Brenztraubensäure-Natriumsulfit-Komplexes abnimmt, indem der Zerfall in Aldehyd-Sulfitkomplex und CO_2, bzw. Bicarbonat eintritt; denn bei den Autoren erfolgt dieser Abbau in einem so geringfügigen Maße, daß von einer automatischen Neutralisation durch den biologischen Vorgang keine Rede sein kann. Die Angabe, daß ein mit Barytwasser genau neutralisiertes schwefligsäurehaltiges Destillat bei nochmaliger Rektifikation über Calciumcarbonat

[1]) Vgl. *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, Ber. 53, 1039, 1920.

wieder SO_2 abgebe, ist im Hinblick auf die obigen Ausführungen unverständlich. Da sekundäre Sulfite nicht flüchtig sind, sondern nur SO_2, könnte ausschließlich dieses übergehen. SO_2 gibt aber keine Fällung mit Bariumchlorid, so daß es auch zweifelhaft erscheinen muß, ob die von den Autoren aus den Destillaten mit Bariumchlorid erzielten und als Bariumsulfit angesprochenen Niederschläge überhaupt SO_2 enthalten haben. Bei richtiger Handhabung ist das Destillationsverfahren von *Neuberg* und *Reinfurth* zur Trennung von Acetaldehyd und schwefligsauren Salzen einwandfrei.

Trotzdem kommen die Autoren, soweit sie aus den von ihnen erzielten geringfügigen Ausschlägen einen Schluß ziehen wollen, zu der Folgerung, daß im Blute eine Substanz vorhanden ist, die aus Brenztraubensäure Acetaldehyd entstehen läßt. Hierzu soll keine Stellung genommen werden.

Im folgenden berichte ich über Tierexperimente, die eine Fortsetzung der Untersuchungen von *Neuberg* und *Gottschalk* (l. c.) über das Auftreten von Acetaldehyd im intermediären Stoffwechsel der Warmblüterorgane bilden und Beweise für die Existenz von tierischer Carboxylase abgeben.

Auf Grund der Feststellung von *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.), daß die beim Zusammentreffen von Brenztraubensäure mit Dinatriumsulfit im molekularen Verhältnis (oder bei einem Überschuß an sekundärem schwefligsauren Salz) entstehende Verbindung

$$CH_3.C(OH)<^{COONa}_{O.SO_2Na}$$

als solche carboxylatisch nicht spaltbar ist, vielmehr erst nach vorheriger Neutralisation der Hälfte der vorhandenen Natriummenge, benutzte ich das von den genannten Autoren empfohlene Gemisch äquivalenter Mengen von Brenztraubensäure, Dinatriumsulfit und Acetat-puffer. Bei solchem Vorgehen erhielt ich folgende Resultate:

1. Ansatz. 60 g Leberbrei (Kaninchen) + 180 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung + 3,0 g Calciumsulfit + 0,7 g Rivanol bei 40^0.

Nach 24 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.

Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.

Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.

Vorlage 2 ccm Wasser.

Destillat 16,0 ccm; Nitroprussid-Piperidinreaktion (in aliquotem Teil) +.

12,0 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung

60 Minuten bei 30^0.

Verbraucht 0,27 − 0,07 = 0,20 ccm n/10 NaOH.

Acetaldehyd = 0,20 . 4,4 . $^4/_3$ = 1,17 mg.

2. Ansatz. 60 g Leberbrei (Kaninchen) + (10 ccm m Brenztraubensäure + 10 ccm m Na_2SO_3 + 10 ccm Acetatgemisch + 150 ccm H_2O + 1,6 g NaCl) + 0,7 g Rivanol bei 40^0.

Nach 24 Stunden: Volumen des Ansatzes 232 ccm, Neutralisation mit Soda, Zusatz von 20 ccm m $BaCl_2$-Lösung und Filtration.

190 ccm des Filtrates über 5 g $CaCO_3$ destilliert und weitere Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 16,0 ccm; Nitroprussid-Piperidinreaktion ++.
12 ccm Destillat + 1,0 ccm 2proz. $(NH_2OH)_2H_2SO_4$-Lösung 60 Minuten bei 30°.
Verbraucht 0,36 − 0,07 = 0,29 ccm n/10 NaOH.
Acetaldehyd insgesamt = 2,24 mg.

3. Ansatz. 68 g Leberbrei (Kaninchen) + 200 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung + 3,0 g Calciumsulfit + 0,8 g Rivanol bei 40°.
Nach 24 Stunden Destillation über 5 g $CaCO_3$.
Redestillation über 5 Tropfen verdünnter H_2SO_4.
Redestillation über 0,3 g $PbCO_3$.
Vorlage 2 ccm Wasser.
Destillat 22,0 ccm; Nitroprussid-Piperidinprobe (in aliquotem Teil) +.
Acetaldehyd = 1,16 mg.
Um den Aldehyd etwa begleitendes Aceton im Enddestillate nicht zu übersehen, wurde in einem aliquoten Teile desselben der Acetaldehyd durch Silberoxyd zerstört und dann nach erneuter Destillation kolorimetrisch und titrimetrisch auf Aceton geprüft.
In diesem Enddestillate war kein Aceton aufzufinden.

4. Ansatz. 68 g Leberbrei (Kaninchen) + (10 ccm m Brenztraubensäure + 10 ccm m Na_2SO_3 + 10 ccm Acetatgemisch + 170 ccm Aqua dest. + 1,8 g NaCl) + 0,8 g Rivanol bei 40°.
Nach 24 Stunden: Volumen des Ansatzes 260 ccm. Neutralisiert und Zusatz von 20 ccm m $BaCl_2$-Lösung, sodann Filtration. 200 ccm Filtrat werden über 5 g $CaCO_3$ destilliert; weitere Aufarbeitung wie unter 1.
Destillat 22 ccm; Nitroprussid-Piperidinreaktion +++.
Acetaldehyd = 3,0 mg.
Die Untersuchung auf Aceton ergab auch hier ein negatives Resultat.

Wie ersichtlich, findet in Gegenwart von Pyruvinaten eine unzweifelhafte Steigerung der Acetaldehydbildung statt, die in den beiden angeführten Beispielen 90 bzw. 160 Proz. ausmachte.

Im Hinblick auf die zahlreichen Wandlungsmöglichkeiten der Brenztraubensäure in tierischen Zellen wurden noch Versuche unter anderen Bedingungen angestellt, nämlich bei *Abschluß von Sauerstoff.* Dabei ging ich in der folgenden Weise vor:

5. Ansatz. 90 bis 110 g Leberbrei (Kaninchen) + 100 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung werden in einem Glaszylinder, der sich im Wasserbade von 40° befindet, 25 Minuten lang mit Stickstoff durchperlt. Das einer Bombe entnommene Gas passiert zunächst eine Waschflasche mit 10proz. Lösung von alkalischer Pyrogallussäure. Daraufhin werden in das Ansatzgefäß 3,0 g frisch gefälltes Calciumsulfit sowie 20 Glaskugeln gegeben und der Inhalt mit vorgewärmter physiologischer Kochsalzlösung auf 380 ccm aufgefüllt. Nach Entfernung etwa vorhandener Gasblasen wird rasch der eingeschliffene Glasstöpsel so in den Hals des Meßzylinders eingeführt, daß der Flascheninhalt luftfrei ist. Alsdann wird der Verschluß paraffiniert und das Gefäß unter öfterem Umschütteln 5 Stunden im Brutschrank bei 40° belassen.

6. Ansatz. In genau der gleichen Weise wie 5., jedoch mit Beigabe von 2,5 ccm m Brenztraubensäure, die unter Eiskühlung sorgfältigst mit Natronlauge neutralisiert gewesen war.

Die Aufarbeitung der beiden Ansätze erfolgte in der gewohnten Art. Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Enddestillate zweier Brenztraubensäureansätze nach dem oben wiedergegebenen Verfahren auf das Vorhandensein von Aceton geprüft, jedoch auch hier ergebnislos. In der folgenden Tabelle sind die Resultate einiger Versuche zusammengestellt:

Acetaldehydbildung des Leberbreies von Kaninchen unter Ausschluß von Sauerstoff.

Nr.	In Kontrolle mg	Im Versuch mit Brenztraubensäurezusatz mg
5— 6	negativ	2,09
7— 8	"	2,26
9—10	"	2,11
11—12	"	1,35
13—14	"	2,84

Im sauerstofffreien Medium und ohne besonderen Zusatz produzieren demnach überlebende Warmblüterzellen auch nicht spurenweise Acetaldehyd.

In genau der gleichen Weise hebt *Anwesenheit von Blausäure* in einer die Gewebsatmung hemmenden Konzentration jede Acetaldehydbildung im Gewebebrei auf.

15. Ansatz. 51 g Leberbrei (Kaninchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,8) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 5 Stunden Aufarbeitung und Titration wie früher.

Acetaldehyd = 0,66 mg.

16. Ansatz. 51 g Leberbrei (Kaninchen) + 150 ccm Tyrode-Phosphatlösung, die KCN in einer Konzentration von m/1000 enthielt, + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 5 Stunden Destillation über 1 g $FeSO_4$ und 5 g $CaCO_3$; weiter in der beschriebenen Weise.

Acetaldehyd: 0.

17. Ansatz. 33 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung (p_H = 6,8) + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 5 Stunden Aufarbeitung und Titration.

Acetaldehyd = 0,51 mg.

18. Ansatz. 33 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 ccm Tyrode-Phosphatlösung, die KCN in einer Konzentration von m/1000 enthielt, + 2,0 g Calciumsulfit bei 40°.

Nach 5 Stunden Destillation über 1 g $FeSO_4$ und 5 g $CaSO_3$; weiter wie oben.

Acetaldehyd: 0.

Kontrollversuche lehrten, daß von einer abgemessenen Menge Acetaldehyd, der 12 Stunden lang in Gegenwart von m/1000 KCN und Calciumsulfit bei 40° gestanden hatte und dann über $FeSO_4$ und $CaCO_3$ destilliert worden war, 85 Proz. zurückgewonnen wurden. Die durch den Zusatz von Kaliumcyanid bedingte Einbuße an Aldehyd — bei Destillation über $FeSO_4$ erfolgt kein Verlust etwa durch Reduktion des Aldehyds — fällt demnach nicht erheblich ins Gewicht.

Diese Befunde stehen durchaus in Übereinstimmung mit der von *Neuberg* und mir wiederholt vertretenen Auffassung, daß der Acetaldehyd auch im tierischen Organismus eine *Oxydationsstufe* darstellt.

Das gilt ebenfalls für den Acetaldehyd, den *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauß*[1]) unter dem Einfluß des Inkrets der Pankreasdrüse in gesteigerter Menge erhalten haben. Die genannten Autoren haben den ersten *direkten Beweis* dafür erbracht, daß eine Oxydationsstufe (Acetaldehyd) durch Zugabe von Insulin zu Geweben in vermehrter Menge mit Hilfe des Abfangverfahrens ans Tageslicht gefördert wird, während nach den Darlegungen[2]) von *Geelmuyden*, *Staub*, *Büchner* und *Grafe*, *Bornstein* sowie anderen jedenfalls für Gaswechseluntersuchungen an ganzen Tieren die Deutung der mit respiratorischen Methoden gewonnenen Daten bezüglich einer die Oxydation beschleunigenden Leistung des Hormons mit großen Unsicherheiten behaftet ist.

Klar ist zugleich, daß durch Zusatz einer Substanz von gleichem Oxydationsgrade wie Acetaldehyd, nämlich der Brenztraubensäure (= Carboxy-acetaldehyd), auch bei Abwesenheit von Sauerstoff die Möglichkeit einer Decarboxylierung, also einer Acetaldehydbildung, gegeben ist. So zeigt auch diese Versuchsserie, daß in *Gewebezellen* ein Ferment vorkommt, das aus Brenztraubensäure Acetaldehyd erzeugt und das, wie für eine Carboxylase zu erwarten ist, unabhängig von Sauerstoffzufuhr wirkt.

---

[1]) *C. Neuberg*, *A. Gottschalk* und *H. Strauß*, Deutsche med. Wochenschr. **1923**, Nr. 45.

[2]) *H. Chr. Geelmuyden*, Klin. Wochenschr. **2**, 1677, 1923; *H. Staub*, ebendaselbst **2**, 2140, 1923; *S. Büchner* und *E. Grafe*, ebendaselbst **2**, 2320, 1923; *A. Bornstein*, ebendaselbst **3**, 681, 1924.

Über die Beziehungen der Hexose-mono-phosphorsäure zur Hexose-di-phosphorsäure.

Von

C. Neuberg und E. Reinfurth.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Im Jahre 1905 haben *A. Harden* und *W. J. Young*[1]) sowie *L. Iwanow*[2]) die Hexose-di-phosphorsäure als Stoffwechselprodukt der Hefe entdeckt; später (1914) haben *A. Harden* und *R. Robison*[3]) auch eine Hexose-mono-phosphorsäure in der Natur aufgefunden. Ob zwischen diesen beiden Estern Zusammenhänge konstitutioneller Art vorhanden sind, ist ungewiß. Wohl aber bestehen Beziehungen zwischen dem wichtigen Hexose-di-phosphat und jenem Hexose-mono-phosphorsäure-ester, den *C. Neuberg*[4]) durch partielle Hydrolyse aus dem zweifach phosphorylierten Produkte gewonnen hat.

A. Harden sowie *W. J. Young*[5]) haben die richtige Zusammensetzung und Molekulargröße der Hexose-di-phosphorsäure ermittelt und in mühseligen Arbeiten die Verwirrungen beseitigt, die angerichtet waren. Die von *A. Lebedew* herrührende falsche Formel nebst Behauptung, daß in dem Ausgangsmaterial des typischen Osazons eine Hexose-mono-phosphorsäure vorliege[6]), widerlegten *Harden* und *Young* durch die Feststellung, daß die von *Lebedew* für ein Phenylhydrazid erklärte Verbindung in Wirklichkeit anders gebaut, nämlich das saure Phenylhydrazinsalz eines Hexose-phosphorsäure-osazons ist, und daß bei dessen Entstehung *ein Molekül Phosphorsäure eliminiert* wird. Daß bei der Osazonreaktion auch sonst *a*-ständige Substituenten ab-

---

[1]) *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Chem. Soc. London **21**, 189, 1905.

[2]) *L. Iwanoff*, Trav. de la Soc. des Naturalistes de St. Petersbourg **34**, 1905; H. **50**, 281, 1907.

[3]) *A. Harden* und *R. Robison*, Proc. Chem. Soc. London **30**, 16, 1914; *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.

[4]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 432, 1918.

[5]) *A. Harden* und *W. J. Young*, diese Zeitschr. **32**, 173, 1911; *W. J. Young*, ebendaselbst **32**, 177, 1911.

[6]) *A. Lebedew*, ebendaselbst **20**, 114, 1909; **28**, 215, 1910.

gestoßen werden, lehrt das Beispiel der Osazonbildung aus den verschiedenen Aminozuckern. Auf Grund dieses Verhaltens konnten *A. Harden* sowie *A. Harden* und *W. J. Young* (l. c.) mit gutem Rechte annehmen, daß einer der beiden Phosphorsäurereste in der Hexose-di-phosphorsäure dem Carbonylrest benachbart steht.

Es erhob sich die Frage: wird bei der milden Hydrolyse durch verdünnte Mineralsäuren, die den *Neuberg*schen Ester gibt, dasselbe Phosphorsäure-radikal abgespalten wie bei dem Übergang in das Osazonsalz?

Schon im Jahre 1918 hatte der eine von uns darauf hingewiesen, daß die durch teilweisen Abbau gebildete Hexose-mono-phosphorsäure Hydrazinderivate liefert. Inzwischen ist die leicht aus dem Zymophosphat (Hexose-di-phosphorsäure-ester) erhältliche Mono-phosphorsäure wegen ihrer angenehmen Eigenschaften von uns und anderen Autoren wiederholt und mit Erfolg zu Fermentversuchen verwendet worden. Zur Charakterisierung der Substanz war es wünschenswert, kristallisierte Salze kennenzulernen, d. h. Verbindungen zu bereiten, welche mit Sicherheit das völlig unveränderte Molekül der Ausgangssubstanz in sich bergen und nicht sekundäre Veränderungen durch irgendwelche Substitutionen erlitten haben. Wie *C. Neuberg* und *O. Dalmer*[1]) gezeigt haben, läßt sich sowohl für das Hexose-di-phosphat als für den aus ihm gewonnenen Mono-phosphorsäure-ester diese Forderung erfüllen. Sie stellten im hexose-di-phosphorsauren Strychnin einerseits und in den Strychnin-, Brucin- und Cinchonidin-salzen der Hexose-mono-phosphorsäure andererseits die ersten kristallisierten wahren Salze her und beschrieben deren Konstanten. Damit war zugleich ein neuer und wünschenswerter Beitrag für die Zusammensetzung des Zymophosphats selbst geliefert. In vollkommener Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Harden* sowie *Harden* und *Young* ergab sich, daß im Zymo-phosphat ein Hexosederivat und nicht, wie manchmal angenommen war, der Abkömmling einer Triose vorliegt. Denn nur aus einem Hexose-di-phosphat (6 C : 2 P), das an sich ja dieselbe prozentische Zusammensetzung wie ein Triose-mono-phosphat (3 C : 1 P) aufweist, kann durch Eliminierung einer Phosphorsäure-gruppe eine Hexose-mono-phosphorsäure hervorgehen, in der nach der Analyse aller Salze eindeutig das Verhältnis von 6 C : 1 P obwaltet.

Naturgemäß sagt die Untersuchung der kristallisierten Alkaloidsalze nichts darüber aus, welcher Phosphorsäure-rest bei der Umwandlung der Hexose-di-phosphorsäure in Hexose-mono-phosphorsäure abgelöst wird. Über diesen Punkt konnte aber die Untersuchung des Osazons Aufschluß geben. Falls dieses sich nämlich als identisch mit der *Harden-Young*schen Verbindung, dem sauren Phenylhydrazinsalz des Hexose-

[1]) *C. Neuberg* und *O. Dalmer*, diese Zeitschr. **131, 188, 1922.**

phosphorsäure-osazons, herausstellte, war *der Beweis geliefert, daß bei der gemäßigten Hydrolyse* — genau wie bei der Osazonbildung — *die a-ständige Phosphorsäure-gruppe hydrolytisch abgespalten wird.*

In der Tat können wir zeigen, daß vollständige Identität vorhanden ist.

In Anbetracht der Möglichkeit, daß auch der natürliche Abbau von Zymo-phosphat stufenweise vor sich geht, d. h. über den Monophosphorsäure-ester fortschreitet, scheint uns der Umstand der Beachtung wert, daß offenbar das a-ständige Phosphorsäure-radikal mit viel geringerer Festigkeit am Zuckermolekül haftet, als der zweite Phosphorsäure-rest.

Wie *Harden* und *Young* (l. c.) dargetan haben, tauscht die vom Osazon sich ableitende komplizierte Phenylhydrazinverbindung des Zymo-phosphats das salzartig gebundene eine Molekül Phenylhydrazin leicht gegen andere Basen, auch anorganische, aus. Deshalb muß man, um die Entstehung von Gemischen zu vermeiden, bei der Osazongewinnung darauf Bedacht nehmen, daß keine fremden Mineralstoffe zugegen sind. Wir haben deswegen zur Herstellung des Osazons aus der Hexose-mono-phosphorsäure stets die freie Säure benutzt, die man aus dem leicht löslichen Ba-Salz durch Zugabe der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure oder aus dem entsprechenden Ca-Salz mittels verdünnter Oxalsäure erhalten kann.

Wir verfuhren folgendermaßen:

1. Darstellung des Phenylhydrazinsalzes des Hexose-phosphorsäure-osazons aus hexose-mono-phosphorsaurem Barium.

2,7 g des Bariumsalzes wurden in 25 ccm Wasser gelöst und mit so viel n Schwefelsäure versetzt, daß eben ein kleiner Überschuß an Sulfat-ionen nachweisbar war. Das Gemenge wurde kurze Zeit geschüttelt und dann wurde in einen Rundkolben filtriert. Darin wurde die nunmehr freie Hexose-mono-phosphorsäure direkt mit der erforderlichen Menge Phenylhydrazin, einschließlich eines kleinen Überschusses im ganzen mit 3 ccm, die in 3 ccm verdünnter Essigsäure gelöst waren, versetzt und sofort 20 Minuten lang in einem siedenden Wasserbade gekocht. Nach dem Abkühlen wurde abgesaugt, mit verdünnter Essigsäure und darauf mit Wasser, Alkohol und Äther gut ausgewaschen. Es resultierten 1,3 g des Osazons vom Schmelzpunkt 150^0. (Die Mutterlaugen wurden hier und im folgenden nicht verarbeitet.) Die Substanz wurde aus Alkohol und Chloroform umkristallisiert, und zwar derart, daß sie zunächst mit der erforderlichen Menge Alkohol in der Siedehitze gelöst wurde; die Flüssigkeit wurde sodann im Vakuum bei 40^0 bis zur beginnenden Trübung eingeengt. Zu dieser konzentrierten alkoholischen Lösung fügten wir etwa ein Viertel des Volumens an heißem



Chloroform, filtrierten und kühlten danach in einer Kältemischung rasch ab. Sofort schied sich die reine Verbindung in feinen goldgelben Nädelchen aus; nach dem Absaugen und Auswaschen mit Alkohol und Äther wurde sie im Hochvakuum bei Zimmertemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ihr F. lag bei 151 bis 152°. Ihre Reinheit wurde durch die Bestimmung des N- und P-Gehaltes sichergestellt.

0,1054 g Substanz: 14,2 ccm N (752 mm, 20°).
0,1546 g Substanz: 0,0313 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0087 g P).

$C_{24}H_{31}O_7N_6P$.	Ber. . . .	N = 15,38,	P = 5,68 Proz.;
	gef. . . .	N = 15,53,	P = 5,64 „ .

Die Phosphorsäureanalyse erfolgte nach der Methode von *Carius*; nach der Oxydation im Bombenrohr wurde zunächst mit Ammoniummolybdat gefällt, der Niederschlag gelöst und darauf in bekannter Weise ins Magnesium-ammonium-phosphat übergeführt.

2. Darstellung des Phenylhydrazinsalzes des Hexose-phosphorsäure-osazons aus dem hexose-mono-phosphorsauren Calcium.

3,16 g des Kalksalzes wurden mit 30 ccm Wasser kalt gelöst und mit der äquivalenten Menge Oxalsäure = 1,26 g (in 10 ccm Wasser) versetzt. Das Filtrat vom Calciumoxalat wurde, wie oben beschrieben ist, mit einer Lösung von 4,5 ccm Phenylhydrazin in 4,5 ccm Essigsäure behandelt und durch Erhitzen das Osazon zur Abscheidung gebracht. Die Ausbeute belief sich auf 2,4 g; F. 149 bis 150°. Nach dem Umkristallisieren wurde auch diese Substanz (F. 151°) analysiert.

7,13 mg Substanz: 0,912 ccm N (766 mm, 18°).
0,2966 g Substanz: 0,0592 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,0165 g P.

$C_{24}H_{31}O_7N_6P$.	Ber. . . .	N = 15,38,	P = 5,68 Proz.;
	gef. . . .	N = 15,12,	P = 5,57 „ .

Die Ermittelung der Phosphorsäure wurde in diesem Falle durch Schmelzen des Materials in der Platinschale mit Soda und Salpeter vorgenommen; dann verfuhren wir, wie oben beschrieben ist.

Zum Zwecke des Vergleichs stellten wir nach der Vorschrift von *Harden* und *Young* (l. c.) das Osazon aus der Hexose-di-phosphorsäure dar, die ihrerseits aus dem Bariumsalz gewonnen war. Beide Phenylhydrazinverbindungen zeigten gleiche Eigenschaften und denselben F., der auch im Gemisch beider Substanzen keine Depression erfuhr.

Von der Identität überzeugten wir uns schließlich noch durch Bestimmung des Drehungsvermögens. Da das Osazon in den meisten indifferenten Lösungsmitteln schwer löslich ist, bedienten wir uns des Pyridin-Alkoholgemisches[1]), von dem der Körper leicht aufgenommen wird.

---

[1]) *C. Neuberg*, Ber. **32**, 3384, 1899.

a) Polarisation der Osazonverbindung aus Hexose-mono-phosphorsäure.

0,0732 g Substanz in 10,0 ccm des Pyridin-Alkoholgemisches (4,0 ccm wasserfreien Pyridins + 6,0 ccm absoluten Alkohols) gelöst; Drehung nach 15 Minuten in 1-dcm-Rohr = — 0,37°; $[\alpha]_{D_{17}} = -50{,}55^0$.

Nach einer Stunde war die Drehung auf — 0,265° gesunken; daraus ergibt sich $[\alpha]_{D_{17}} = -36{,}20^0$.

b) Polarisation der Osazonverbindung aus Hexose-di-phosphorsäure.

0,1041 g Substanz in 10,0 ccm Pyridin-Alkoholgemisch; Drehung nach 15 Minuten im 1-dcm-Rohr = — 0,53°; $[\alpha]_{D_{17}} = -50{,}91^0$.

Nach einer Stunde war die Drehung auf — 0,375° gefallen; daraus folgt $[\alpha]_{D_{17}} = -36{,}02^0$.

Die Lösungen sind bei Zimmertemperatur bereitet gewesen. Es bleibe dahingestellt, ob die Drehungsabnahme beim Aufbewahren mit Erscheinungen von Mutarotation zusammenhängt oder einfach darauf beruht, daß Pyridin als Base mit dem salzartig gebundenen einen Molekül Phenylhydrazin der Osazonverbindung sich umsetzt. Innerhalb 36 Stunden blieb der nach einer Stunde erreichte Wert konstant. Jedenfalls zeigten beide Substanzen nach der Auflösung zu gleichen Zeiten die identische optische Aktivität.



Autorenverzeichnis.